

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Regeneration chondraler Knorpeldefekte durch
Implantation von BMP-2-genmodifizierten
Muskelfaszien**

Eine Studie im Schafmodell

von Tina Angelika Ullmann

aus Roth

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der
Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation,
Klinikum der Universität München

Mentor: Dr. hum. biol. Oliver Betz

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	10
II.	LITERATURÜBERSICHT	13
1.	Anatomie und Physiologie des Gelenkknorpels	13
1.1.	Aufbau des Gelenkknorpels	13
1.2.	Zonen des Gelenkknorpels	15
1.3.	Physiologie des Gelenkknorpels	16
2.	Knorpeldefekte und Knorpelheilung	17
3.	Aktuelle Therapiemöglichkeiten von Knorpeldefekten.....	20
3.1.	Konservative Therapieansätze.....	20
3.2.	Operative Techniken	20
3.2.1.	Mechanische Knorpelglättung.....	21
3.2.2.	Knochenmarksstimulierende Techniken	21
3.2.2.1.	Pridie-Bohrung	22
3.2.2.2.	Mikrofrakturierung	22
3.2.2.3.	Abrasionsarthroplastik.....	24
3.2.3.	Transplantation von Knorpelgewebe.....	24
3.2.3.1.	Osteochondrale autologe Transplantation	24
3.2.3.2.	Osteochondrale allogene Transplantation.....	26
3.2.4.	Transplantation von Zellen	27
3.2.4.1.	Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT).....	27
3.2.4.2.	Matrix-Assoziierte Chondrozyten Transplantation (MACT)	29
4.	Regenerative Therapiestrategien: Tissue Engineering	30
4.1.	Zelltypen.....	31
4.1.1.	Chondrozyten.....	31
4.1.2.	Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	31
4.2.	Trägersubstanzen	32
4.3.	Wachstumsfaktoren: Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).....	33
4.4.	Gentherapie	35
4.4.1.	Methodik des Gentransfers	35
4.4.2.	Vektoren.....	36
4.4.3.	Adenoviren in der Gentherapie	36

4.4.4.	Muskelgewebe und Gentransfer	38
5.	Tiermodell	38
6.	Aufgabenstellung.....	39
III.	MATERIAL UND METHODEN	42
1.	Material	42
1.1.	Vektor und BMP-2.....	42
1.2.	Tier und Tierhaltung	43
1.3.	Autologe Muskelgewebestücke.....	44
2.	Methoden	45
2.1.	Studiendesign	45
2.2.	Präoperative Vorbereitung der Versuchstiere	45
2.3.	Operation	48
2.3.1.	Freilegen des rechten medialen Femurkondylus.....	48
2.3.2.	Gewinnung der autologen Muskelfaszienstücke	48
2.3.3.	Durchführung des Gentransfers	49
2.3.4.	Setzen der chondralen Knorpeldefekte	50
2.3.5.	Pridie-Bohrung	51
2.3.6.	Reimplantation der autologen Muskelfaszienstücke	53
2.3.7.	Wundverschluss.....	53
2.4.	Postoperatives Management und Überwachung.....	53
2.5.	Tötung und Sektion der Tiere.....	54
2.6.	Aufbereitung der Präparate zur weiteren Analyse.....	55
2.7.	Auswertung	56
2.7.1.	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	56
2.7.2.	Biomechanische Auswertung.....	59
2.7.2.1.	Prinzip des Indentationstests	59
2.7.2.2.	Steifigkeit als biomechanische Messgröße	62
2.7.2.3.	Versuchsdurchführung	62
2.7.2.4.	Lokalisierung des Messortes.....	64
2.7.3.	Immunhistochemie und Histologie	66
2.7.3.1.	Vorbereitung der Proben	66
2.7.3.2.	Anfertigen von Schnitten am Mikrotom	68
2.7.3.3.	Färbungen.....	68

2.7.3.4.	Erweiterter O'Driscoll-Score	71
2.7.4.	Statistik	74
IV.	ERGEBNISSE.....	75
1.	ELISA Auswertung.....	75
2.	Makroskopische Beurteilung	78
3.	Biomechanik.....	79
3.1.	Messung nach makroskopischer Beurteilung.....	79
3.2.	Fünf-Punkt-Messung.....	84
4.	Histologische Auswertung	87
4.1.	Leerdefekte nach Pridie-Bohrung.....	87
4.2.	Mit nativem Muskelfasziengewebe behandelte chondrale Defekte (M (120) und M (180))	89
4.3.	Mit BMP-2 genmodifiziertem Muskelfasziengewebe versorgte chondrale Defekte (M Ad.BMP-2 (120) und M Ad.BMP-2 (180)).....	93
4.4.	Ergebnisse des erweiterten O'Driscoll-Scores	98
V.	DISKUSSION.....	102
1.	Diskussion der Methoden.....	103
1.1.	Tiermodell Schaf	103
1.2.	Adenoviraler Gentransfer und BMP-2	105
1.3.	OP-Technik und Beobachtungszeitraum.....	107
1.4.	Indentationstest.....	108
1.5.	Modifizierter O'Driscoll-Score.....	109
2.	Diskussion der Ergebnisse	110
2.1.	ELISA-Messungen	110
2.2.	Biomechanik.....	112
2.3.	Diskussion der makroskopischen und histologischen Ergebnisse .	115
3.	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick	121
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	123
VII.	SUMMARY.....	126
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	128

IX.	ANHANG	150
X.	DANKSAGUNG	155

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	PBS	Phosphate-buffered saline
ACI	Autologous chondrocyte implantation	PFA	Paraformaldehyd
ACT	Autologous chondrocyte transplantation	rhBMP	Rekombinantes humanes BMP
BMP	Bone morphogenetic protein	TGF- β	Transforming growth factor beta
d	Durchmesser	s	Sekunde
DNA	Desoxyribonucleic acid	SAF-O	Safranin Orange
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	s.c.	subkutan
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	vs.	versus
et al.	Et altera		
EZM	Extrazelluläre Matrix		
GMP	Good Manufacturing Practice		
IGF-1	Insulin like growth factor		
IL	Interleukine		
i.m.	intramuskulär		
i.v.	intravenös		
KL	kontralateral		
L	Leerdefekt		
M	Muskelfaszie		
MACT	Matrix-assoziierte Chondrozyten-transplantation		
M Ad. BMP-2	Muskelfaszie mit BMP-2		
mm	Millimeter		
MDSC	muscle derived stem cell		
MSC	Mesenchymal stem cell		
nm	Nanometer		
PB	Pridie Bohrung		

I. EINLEITUNG

Mit zunehmender durchschnittlicher Lebenserwartung steigt auch die Zahl altersbedingter Erkrankungen stetig an. Neben Herz-/Kreislauferkrankungen spielen auch degenerative Veränderungen an Gelenken (Arthrose) eine immer größere Rolle. Im Jahr 2011 war laut statistischem Bundesamt eine Arthrose des Hüft- oder Kniegelenks die häufigste Diagnose, die zu einem vollstationären Aufenthalt in einer Vorsorge- oder Rehabilitationseinrichtung führte. Rund 13 % der insgesamt 1,6 Millionen Patienten wurden deshalb stationär behandelt (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2013). Die Summe der Leistungen für die klinische Therapie von Arthrose belief sich in Deutschland 2008 auf ca. 7,6 Milliarden Euro, wobei 73 % dieser Ausgaben auf die ältere Patientenpopulation über 65 Jahre fiel (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2010). Diese Zahlen machen deutlich, welche Bedeutung dieser Form der Gelenkserkrankung zugesprochen werden muss.

Abgesehen vom hohen finanziellen Aufwand, ist das Krankheitsbild der Arthrose auch für den einzelnen Patienten eine große Belastung. Es kommt bei dieser Erkrankung zum langsamen und stetigen Abbau von Gelenkknorpel. Dieser Prozess geht meist mit Schmerzen und Funktionseinschränkungen einher und hat für den Betroffenen deutliche Einschränkungen im Alltag und einen erheblichen Verlust an Lebensqualität zur Folge (RABENBERG, 2013).

Für das zunehmende Auftreten von Arthrose spielen jedoch auch noch andere Faktoren als das fortschreitende Alter eine Rolle, insbesondere Übergewicht, mangelnde Bewegung sowie übermäßige Sport- und Freizeitaktivitäten, weshalb auch zunehmend jüngere Patienten an frühzeitigem Gelenkverschleiß leiden (RUDERT & WIRTH, 1998). Besonders häufig von Gelenkdegeneration betroffen ist das Kniegelenk (ERGGELET, 1998).

Bis heute ist Arthrose unheilbar. Bereits 1743 erkannte der schottische Anatom William Hunter, dass sich Knorpel, wenn er einmal zerstört ist,

nicht wieder reparieren lässt (HUNTER, 1995). In der Tat stellt die Avaskularität von Knorpelgewebe ein Problem für die Regenerationsfähigkeit dar. Je nach Ausmaß des Defektes kommt es zu unterschiedlichem Wirken der limitierten Selbstheilungskräfte: Rein chondrale Defekte, bei denen die darunterliegende Knochenlamelle unversehrt ist, besitzen keinerlei Möglichkeit zur Spontanheilung (HUNZIKER & ROSENBERG, 1996). Ist der subchondrale Knochen von der Schädigung betroffen (osteoochondraler Defekt), können multipotente mesenchymale Stammzellen ins Defektgebiet einwandern und es entsteht ein faserknorpeliges Ersatzgewebe (SHAPIRO et al., 1993a). Dieses Reparaturgewebe ist aber von minderer Qualität und kann den physiologischen Belastungen im Gelenk nur schwer standhalten (FRENKEL & DI CESARE, 1999). Aus diesen Gründen stellt die optimale Therapie von Knorpeldefekten bis heute eine Herausforderung für die klinische Praxis dar und ist Schwerpunktthema in der experimentellen orthopädischen Forschung.

Aktuelle Therapiemöglichkeiten von Knorpeldefekten umfassen zum einen die konservative Behandlung (z.B. Physiotherapie, Schmerzmedikamente, nicht-steroidale Antiphlogistika), zum anderen operative Methoden wie knochenmarksstimulierende Techniken (z.B. Pridie-Bohrung, Mikrofrakturierung) bei chondralen Defekten oder die Transplantation von Knorpelgewebe oder -zellen bei osteochondralen Defekten (MARLOVITS & VÉCSEI, 2000b; MELTON & COSSEY, 2011). Die klinische Symptomatik sowie die Funktionsfähigkeit des Gelenks können durch diese Therapiemethoden kurzfristig verbessert werden. Allerdings liefert bislang keine dieser Behandlungen zufriedenstellende Langzeitergebnisse, da es niemals zu einer Wiederherstellung des ursprünglichen hyalinen Knorpelgewebes kommt. Das kurzfristig entstehende, minderwertige Ersatzgewebe degeneriert und es kommt wiederum zu Schäden am Gelenk (RUDERT & WIRTH, 1998).

Einen neuartigen Ansatzpunkt stellt der Einsatz genmodifizierter Zellen im Rahmen des sogenannten „Tissue Engineering“ dar. Hierbei wird Zellen durch gezielte Modifikation ihres Genoms die Fähigkeit zur Herstellung von Wachstumsfaktoren (z.B. bone morphogenetic proteins oder TGF- β)

verliehen. Nach Einbringen der Zellen in den Defekt sollen die von ihnen produzierten Proteine die Proliferation von Chondrozyten anregen und damit zu einer Regeneration von Knorpelgewebe, im Idealfall sogar zur Entstehung von hyalinem Knorpel, beitragen (KESSLER & GRANDE, 2008).

Ziel dieser Studie war es, mithilfe einer neuartigen Strategie aus dem Bereich des Tissue Engineering, eine Regeneration von Knorpelgewebe in einem mit dem Menschen vergleichbaren Großtiermodell (Schaf) zu erzielen. Es sollte untersucht werden, ob durch Transplantation von BMP-2-genmodifiziertem, autologem Muskelfasziengewebe, chondrale Knorpeldefekte kritischer Größe im Kniegelenk schnell, reproduzierbar und biomechanisch stabil geheilt werden können.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Anatomie und Physiologie des Gelenkknorpels

Gelenkknorpel ist ein avaskuläres, aneurales Gewebe, das Knochenenden überzieht und dort als Schutzschicht fungiert. Dieses nur wenige Millimeter dicke Gewebe erlaubt zusammen mit der synovialen Flüssigkeit eine nahezu reibungsfreie Bewegung in Diarthrosen und verteilt die in Form von Gewicht, Reibung und Stößen einwirkenden Kräfte (HARDINGHAM, 2010a).

1.1. Aufbau des Gelenkknorpels

Als hyaliner Knorpel hat Gelenkknorpel ein glasig, glänzendes Erscheinungsbild. Er setzt sich aus der extrazellulären Matrix (EZM), den Knorpelzellen, sogenannten Chondrozyten, und gebundenem Wasser zusammen (TILLMANN, 1987).

Chondrozyten

Die Chondrozyten machen nur einen sehr geringen Teil des Gelenkknorpels aus. Eingebettet in die EZM besteht ihre Aufgabe hauptsächlich in der Synthese und im Abbau von Kollagenen und Proteoglykanen (POOLE et al., 2001).

Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix gleicht dem Aufbau eines regelhaft gesponnenen Netzes, das hauptsächlich aus Kollagenen, Proteoglykanen und Wasser besteht (RUDERT & WIRTH, 1998).

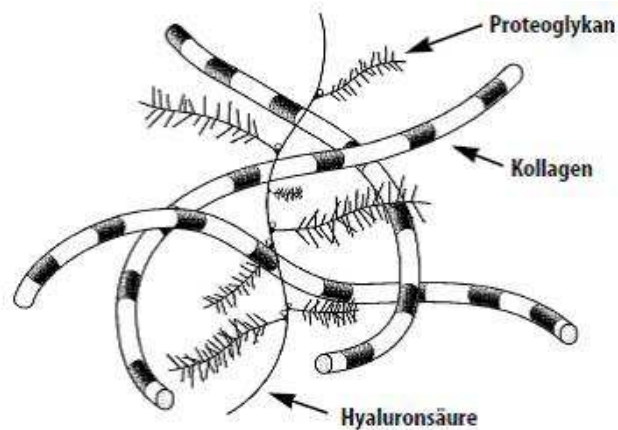


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Knorpelmatrix (entnommen aus (RUDERT & WIRTH, 1998))

Im hyalinen Knorpel findet man hauptsächlich Kollagen Typ II vor, was ca. 90-95 % des Kollagenvolumens im Gelenkknorpel ausmacht. Der Rest des Kollagenanteils verteilt sich auf Kollagen vom Typ I, V, VI, IX, X und XI (BURGESON & NIMNI, 1992). Kollagen Typ I ist wiederum Hauptbestandteil von Faserknorpel, wie er in Menisken oder Bandscheiben vorkommt.

Die Kollagenfibrillen sind strukturiert angeordnet und verleihen so dem Knorpel seine Zugfestigkeit (CURWIN, 2011). Zudem verankern sie den Knorpel tief im subchondralen Knochen. Proteoglykane und Chondrozyten werden durch das dichte Netzwerk an ihrem Platz gehalten (CHU, 2001).

Ein weiterer Bestandteil der EZM sind Proteoglykane. Dabei handelt es sich um Makromoleküle mit einem Kernprotein und sulfatierten Polysaccharideinheiten, den sog. Glykosaminoglykanen. Proteoglykane weisen ein extrem hohes Wasserbindungsvermögen auf und sind so für die Druckelastizität des Knorpels verantwortlich (ATHANASIOU et al., 1991). Das größte und häufigste Proteoglykan im Gelenkknorpel ist Aggrekan. Aggrekan ist oftmals über Hyaluronsäure, einem nicht sulfatierten Glykosaminoglykan, zu sehr großen Molekülaggregaten verbunden (ROUGHLEY & LEE, 1994).

Wasser

Eine äußerst essentielle Bedeutung für die Sicherung der

Knorpelgrundfunktionen, insbesondere Lastenverteilung und reibungsfreie Bewegungsabläufe, besitzt Wasser. Dieses macht ca. 60 bis 85 % des Gesamtgewichts des Knorpels aus (MOW et al., 1993). Während der Bewegung findet eine Kompression des Knorpelgewebes statt, weshalb es zu einer Verdrängung von Flüssigkeit aus der Knorpelmatrix kommt. Bei Entlastung strömt dieses Wasser wiederum zurück in die Matrix. Diese viskoelastische Eigenschaft von Gelenkknorpel ist die Basis für seine einzigartige Funktionsfähigkeit (HOU et al., 1992).

1.2. Zonen des Gelenkknorpels

Je nach Tiefe der Knorpelschicht, sind die zuvor beschriebenen Komponenten des Gelenkknorpels unterschiedlich angeordnet. Man kann den Gelenkknorpel so in verschiedene Zonen unterteilen.

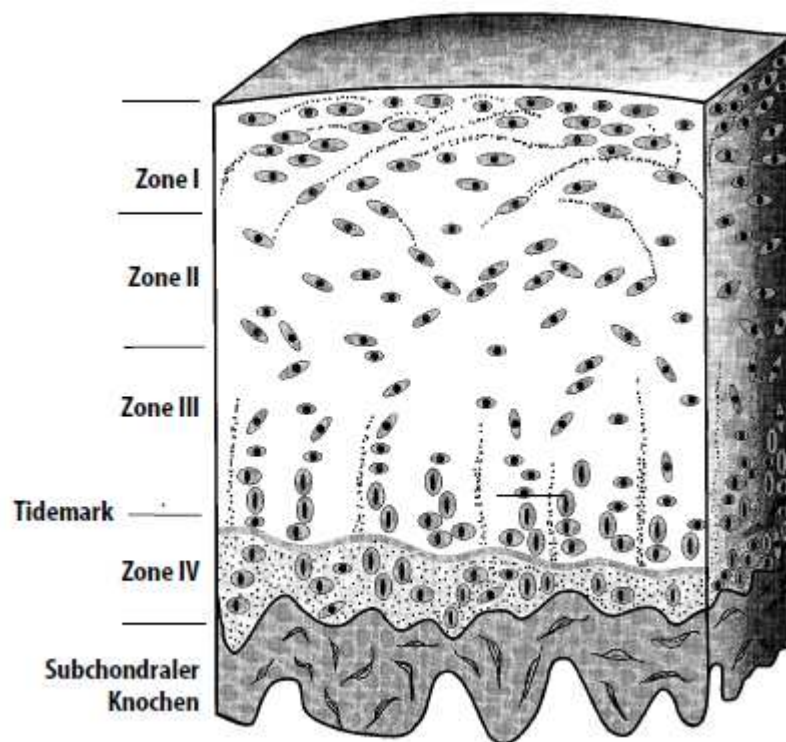


Abbildung 2: Zonen des Gelenkknorpels. I: Oberflächliche Tangentialzone. II: Übergangszone. III: Radiärzone. IV: Zone des mineralisierten Knorpels (entnommen aus (RUDERT & WIRTH, 1998))

In den vier Zonen sind Chondrozyten, Kollagene, Proteoglykane und Wasser in unterschiedlichen Anteilen zu finden.

Die oberflächliche Tangentialzone (Zone I) enthält vorwiegend

spindelförmig angeordnete Knorpelzellen und parallel zur Gelenkoberfläche gelegene Kollagenfibrillen. Da Kollagen ein hohes Maß an Anpassungsfähigkeit bei wirkenden Dehnungskräften aufweist, gestattet diese Kollagenanordnung an der Oberfläche eine optimale Lastenverteilung über die gesamte Gelenkfläche (KEMPSON et al., 1973; AKIZUKI et al., 1986; RUDERT & WIRTH, 1998).

In der Übergangszone (Zone II) ist die Zelldichte geringer. Die Chondrozyten sind von eher rundlicher Gestalt und liegen oft in Chondronen zusammen. Kollagenfibrillen sind eher zufällig angeordnet und in geringerem Ausmaß vorhanden. Vorherrschend in dieser Zone sind hier Proteoglykane, vor allem Aggrekan (SCHWARTZ, 2006).

Die breiteste Zone ist die Radiärzone. In dieser sind die Knorpelzellen zu Säulen angeordnet. Die Konzentration von Aggrekan ist hier am höchsten, dieselbige von Kollagenen und Wasser am niedrigsten (VENN, 1978; POOLE et al., 2001).

Die Zone des mineralisierten Knorpels (Zone IV) zeigt den Übergang der Gelenkknorpel- in die subchondrale Knochenmatrix. Chondrozyten weisen einen hypertrophischen Phenotyp auf. In der kalzifizierten extrazellulären Matrix ist der Anteil an Proteoglykanen am niedrigsten. Zwischen der Radiärzone und der Zone des mineralisierten Knorpels ist eine basophile Grenzlinie, die sog. „Tidemark“, vorhanden (REDLER et al., 1975; POOLE et al., 2001).

1.3. Physiologie des Gelenkknorpels

Der zuvor erläuterte Aufbau des Gelenkknorpels ist ausschlaggebend für seine drei Hauptfunktionen: die praktisch reibungsfreie Bewegung, die Kraftübertragung zwischen artikulierenden Knochenenden und seine stoßdämpfende Eigenschaft. Dabei ist aber auch das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten von entscheidender Bedeutung. Der solide Teil des Knorpels, die sog. „feste Phase“, in Gestalt der extrazellulären Matrix und der Knorpelzellen, bietet einen gewissen Halt und Widerstand. Die „flüssige Phase“ in Form von Wasser gewährleistet die Flexibilität und Verformbarkeit des Knorpels. Es kommt nun unter Belastung zu einer Phasenverschiebung. Das im Kollagengerüst und an Proteoglykanen

gebundene Wasser wird über molekulare Poren aus dem Gewebe herausgepresst. Bei anschließender Entlastung wird diese Verschiebung rückgängig gemacht. Dieses Verhalten wird auch als viskoelastische Eigenschaft von Gelenkknorpel bezeichnet (LINN & SOKOLOFF, 1965; MAROUDAS & BANNON, 1981; LAI et al., 1991; MOW et al., 1993).

Die Interaktion der Phasen ermöglicht es so, Kompressionskräften von einem Vielfachen des Körpergewichts und enormen Scherkräften standzuhalten (LU & MOW, 2008).

Die wirkenden Kräfte sind auch für die Ernährung des Knorpels äußerst wichtig. Durch seine Avaskularität ist Knorpelgewebe auf den passiven Stoffaustausch über Diffusion von Nährstoffen aus der synovialen Flüssigkeit abhängig. (HARDINGHAM, 2010b). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine gewisse Bewegung und Belastung des Gelenks notwendig für die Aufrechterhaltung von Struktur und den mechanischen Eigenschaften des Knorpelgewebes ist (KIVIRANTA et al., 1987; JORTIKKA et al., 1997).

2. Knorpeldefekte und Knorpelheilung

Die Ursachen für eine Schädigung des Knorpelgewebes sind vielschichtig. So kann es beispielsweise im Rahmen sportlicher Aktivität zu akuten Traumata kommen oder Knorpel wird in Folge einer Gelenkinfektion geschädigt. Auch eine Fehlstellung der Gliedmaße mit resultierender Fehlbelastung der Gelenkflächen kann Ursache für Knorpelabnutzung und -verletzung sein. Unabhängig davon, welcher Grund für die Knorpelläsion vorliegt, kommt es in sehr vielen Fällen zu einem degenerativen Prozess, bei dem es zu einem progressiven Verlust normaler Knorpelstruktur kommt (BUCKWALTER et al., 2005). Dies führt zum klinischen Bild der klassischen Arthrose. Besonders ältere Patienten leiden unter den klinischen Symptomen wie Schmerzen und limitierter Beweglichkeit einer ideopathischen Osteoarthrose (MARLOVITS, 2000).

Die Selbstheilung von Knorpelgewebe ist stark eingeschränkt, da das Gewebe nicht wie andere Gewebearten wie Muskel oder Knochen von Gefäßen versorgt wird, sondern sich nur über Diffusion ernährt. So

können bei Läsionen keine Entzündungszellen an den Defektort migrieren (MANKIN, 1974a). Bereits 1743 stellte der britische Anatom William Hunter fest, dass „ein ulzerierter Knorpel sich nicht wieder reparieren lässt, wenn er einmal zerstört ist“ (HUNTER, 1995). Dennoch gilt es, bei der Beurteilung von Knorpelverletzungen differenzierter vorzugehen. Je nachdem wie schwerwiegend der Defekt ausfällt, d.h. welche Zonen des hyalinen Knorpels im Gelenk betroffen sind, ist das Heilungspotential unterschiedlich zu bewerten (BUCKWALTER, 1998).

Es gibt grundsätzlich drei Arten von Knorpeldefekten:

- Mikroverletzungen: Die Knorpeloberfläche bleibt intakt, aber die innere Matrix und evtl. der subchondrale Knochen werden durch stumpfe Traumata oder einzelne Spitzenbelastungen geschädigt.
- Chondrale Defekte: Die Läsion erstreckt sich von der Knorpeloberfläche bis maximal zur Zone des mineralisierten Knorpels; der subchondrale Knochen bleibt dagegen unversehrt.
- Osteochondrale Defekte: Es erfolgt eine Schädigung von der Knorpeloberfläche bis hinein in den subchondralen Knochen.

Charakteristisch für Mikroverletzungen ist je nach Ausmaß der Läsion, auf morphologischer Ebene eine vermehrte Synthese von Kollagenen und Proteoglykanen durch Chondrozyten, um die zerstörte Matrix wiederherzustellen. Deren Regenerationskapazität ist jedoch begrenzt, da sie in der Matrix gefangen bleiben und nicht zu anderen Orten der Läsion wandern können (MANKIN, 1974b). Im Weiteren erfolgt eine Auflösung der Kollagenstruktur unter Verlust von Proteoglykanen und eine Verdickung der subchondralen Knochenplatte. Es kommt zur Entstehung von Fissuren, Ulzerationen und einer Aufweichung des oberflächlichen Knorpels, was mit dem Verlust der biomechanischen Eigenschaften einhergeht (DEKEL & WEISSMAN, 1978; CHEN et al., 1999).

Die Heilungsaussichten für chondrale Defekte sind ebenfalls sehr ungünstig aufgrund der fehlenden Blutgefäßversorgung und der daraus resultierenden Abwesenheit von Entzündungs- und Heilungsfaktoren. Ohne Blutversorgung entsteht kein Fibringerinnsel und es erfolgt kein

Einwandern von Reparaturzellen wie es bei normaler Wundheilung der Fall ist (CHU, 2001). Makroskopisch gesehen rundet sich der chondrale Defekt an seinen Kanten zunächst ab, und bildet Reparaturgewebe aus Faserknorpel, der langfristig aber wieder abgetragen wird (RUDERT & WIRTH, 1998). Auf morphologischer Ebene kann man eine anfängliche Nekrose der Knorpelzellen beobachten, der eine erhöhte metabolische und mitotische Aktivität der verbliebenen Chondrozyten an der Grenze des Defektes folgt. Diese Phase ist aber nicht von langer Dauer und die Chondrozytenproliferation und -aktivität versiegt. Der Reparaturversuch der Chondrozyten reicht nicht aus, um die Knorpelmatrix wiederherzustellen. Studien zeigten, dass solche Defekte über längere Zeit stabil bleiben können. Je nach Größe der Läsion kann es aber im weiteren Verlauf zu osteoarthrotischen Veränderungen kommen. In keinem Fall aber kommt es zu einer Heilung des Defektes (CAMPBELL, 1969; FULLER & GHADIALLY, 1972; CHEUNG et al., 1978; MANKIN, 1982).

Die Heilung von osteocondralen Defekten ist theoretisch möglich, da durch die Penetration der subchondralen Knochenschicht eine Verbindung zum Knochenmarksraum entsteht. Ein Fibringerinnsel bildet sich im Defektbereich. Es kommt zum Einwandern und zur Proliferation von multipotenten, mesenchymalen Stammzellen innerhalb des Fibrinpropfes, der langsam durch die sich osteogen bzw. chondrogen differenzierenden Zellen ersetzt wird. Knorpelzellen produzieren verstärkt Kollagen Typ II und es entsteht ein hyalinartiges Knorpelgewebe, welches den Defekt nach und nach vollständig ausfüllt (SHAPIRO et al., 1993b; MARLOVITS & VÉCSEI, 2000a). Später jedoch ist immer noch ein hoher Anteil an Kollagen Typ I vorhanden (BUCKWALTER, 1998). Die wiederhergestellten Kollagenfasern sind außerdem nicht in der Art und Weise in den angrenzenden gesunden Knorpel integriert wie ursprünglich (SHAPIRO et al., 1993b). Dies kann zu vertikalen Scherkräften führen, die ungünstig auf das Reparaturgewebe wirken und so degenerative Veränderungen hervorrufen können (NEWMAN, 1998).

Mittelfristig erfolgt ein Umbau des hyalinartigen Knorpels in Faserknorpel (WAKITANI et al., 1994). Dieser ist jedoch nicht dazu ausgelegt, Druckkräften oder Langzeitbelastungen standzuhalten (FURUKAWA et al., 1980; KIM et al., 1991). Langfristig kann es daher zu degenerativen Gelenkerkrankungen kommen. Eine Heilung im eigentlichen Sinne, nämlich eine Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebezustandes, kann folglich auch im osteochondralen Defekt langfristig nicht erzielt werden.

3. Aktuelle Therapiemöglichkeiten von Knorpeldefekten

Im Vordergrund bei der Behandlung von Patienten, die an den beschriebenen Knorpeldefekten leiden, steht die Erzielung von Schmerzfreiheit und eine Wiederherstellung der Beweglichkeit. Bei der Behandlungsentscheidung sind das Aktivitätslevel des Patienten, sein Alter, die Ursache, Größe und Tiefe der Läsion und die Anzahl der Defekte zu berücksichtigen (SEO et al., 2011).

3.1. Konservative Therapieansätze

Konservative Therapien umfassen die Gabe von nicht-steroidalen Antiphlogistika, Schmerzmedikamenten, Hormonen (z.B. Östrogen, Wachstumshormone) und Chondroprotektiva (Glucosamin, Chondroitinphosphat, Omega-3), intraartikuläre Injektionen von Steroiden oder Hyaluronsäure, eine Gewichtsreduktion und Physiotherapie. Dies alles kann zur Schmerzbekämpfung beitragen und die Beweglichkeit wieder verbessern. Dennoch können diese Methoden lediglich eine Symptomlinderung erzielen und nicht die Ursache der Erkrankung bekämpfen (MESSNER & MALETIUS, 1996; GUETTLER et al., 2004).

3.2. Operative Techniken

Hier kommen verschiedene operative Therapiestrategien einzeln oder in Kombination zum Einsatz. Alle haben ein gemeinsames Ziel: Die Herstellung eines Reparaturgewebes im Defektgebiet, das möglichst alle biomechanischen Funktionen erfüllt, die gesunder hyaliner Gelenkknorpel besitzt. Fortschreitende degenerative Gelenkveränderungen sollen so

verhindert werden.

3.2.1. Mechanische Knorpelglättung

Zur Behandlung von fokalen, rein chondralen Defekten geringen Ausmaßes kann zur Glättung der Knorpeloberfläche das sog. Debridement zum Einsatz kommen. Dabei werden lose Knorpelfragmente, die die physiologische Gelenkbewegung stören und zu Synovitis führen können, entfernt und die raue Knorpeloberfläche mechanisch glatt „rasiert“. So soll das verbliebene Knorpelgewebe vital bleiben und vor progressiver Schädigung geschützt werden (SEO et al., 2011). Dies wurde aber bereits widerlegt, indem eine gesteigerte Fibrillation und Nekrose im angrenzenden Knorpel beschrieben wurde (SCHMID et al., 1988). Alternativ kann ein Laser als Shaving-Instrument benutzt werden. Hierdurch kommt es aber bei flächenhafter Anwendung zur Versiegelung der Knorpeloberfläche, was die Diffusion von Stoffen und damit die Ernährung des Gewebes stört. Dies kann folglich zur Knorpeldegeneration führen (RAUNEST & DERRA, 1996). Außerdem sind Fälle von Osteonekrose und Chondrolyse als mögliche Folgeschäden beschrieben (BONUTTI et al., 2006). Beide Glättungsmethoden gehen nicht mit Regeneration des abgetragenen Knorpelgewebes einher und erzielen nur eine temporäre Reduktion der Symptome (KIM et al., 1991; MARLOVITS & VÉCSEI, 2000b).

3.2.2. Knochenmarksstimulierende Techniken

Knochenmarksstimulierende Operationsmethoden kommen meist sehr früh als erste Therapieoption sowohl für chondrale als auch osteochondrale Defekte zum Einsatz (GOMOLL et al., 2010).

Als gemeinsames Charakteristikum zeichnen diese Methoden eine mechanische Penetration des subchondralen Knochens und eine Eröffnung des darunterliegenden Knochenmarkraumes aus. Mit dem Blutstrom gelangen so u.a. mesenchymale Stammzellen, Zytokine und Wachstumsfaktoren in das Defektgebiet und eine Gefäßeinsprossung findet statt. Die Bildung eines fibrösen Reparaturgewebes wird so angeregt (DANDY, 1986; KIM et al., 1991; SHAPIRO et al., 1993b).

Experimentelle Studien zeigten die Bedeutung des subchondralen

Knochens für die Reparaturfähigkeit von Knorpelgewebe. So konnte bei Kaninchen zwei Monate nach mehrmaligem Anbohren des Knorpels an den Femurkondylen bis in den subchondralen Knochen hinein, ein hyalinartiges Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Dieses unterlag jedoch einem Umbauprozess und war acht Monate später stark bindegewebig durchsetzt (MITCHELL & SHEPARD, 1976). Auch klinisch ließ sich diese Art der Gewebeneubildung in Form von hyalinartigem Knorpelgewebe hin zu seiner Veränderung in faserknorpeliges Gewebe feststellen. Dieser Faserknorpel besitzt hauptsächlich Kollagen Typ I und kann eine Haltbarkeit von mehreren Jahren aufweisen. Auf lange Sicht ist er aber nicht von Bestand, da er aufgrund seiner Beschaffenheit nicht die biomechanischen Eigenschaften wie natives Knorpelgewebe aufweist (BUCKWALTER, 1998; JOHNSON, 2001).

3.2.2.1. Pridie-Bohrung

Die Pridie-Bohrung stellt eine schon sehr lange etablierte Behandlungsmöglichkeit dar. Der englische Orthopäde und Chirurg Kenneth Hampden Pridie hat erstmals im Jahr 1959 dieses Verfahren zur Reparatur von Knorpeldefekten mittels Bohrung angewandt (MARLOVITS & VÉCSEI, 2000b). Üblicherweise wird der Defekt vor der eigentlichen Bohrung per Debridement geglättet. Mithilfe eines Bohrers (ca. 2 mm Durchmesser) werden arthroskopisch Löcher bis zu einer Tiefe von 4 cm und im Abstand von etwa 5 mm in den subchondralen Knochen gebohrt. Es kommt zur Einblutung in den Defekt. Über die in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Kaskaden entsteht ein neuartiges Reparaturgewebe. Durch die Bildung eines zunächst belastbaren Faserknorpels kann bei vielen Patienten kurzfristig eine starke Symptomreduktion erreicht werden (NEWMAN, 1998). Langfristig kommt es aber ebenfalls zur Degeneration des Faserknorpels (MENCHE et al., 1996).

3.2.2.2. Mikrofrakturierung

Mikrofrakturierung wurde erstmals von Steadman beschrieben (STEADMAN et al., 1997). Diese Methode ist momentan Standard in der Therapie von hochgradig symptomatischen, fokalen, chondralen Defekten im Kniegelenk. Dabei sollte der zu behandelnde Defekt nicht größer als 4

cm² sein.

Nach Abtragen (Debridement) und Kürettieren des Knorpels bis auf den subchondralen Knochen, werden mehrere Löcher (Durchmesser 0,5-1,0 mm) im Abstand von 3-4 mm in den freiliegenden subchondralen Knochen mithilfe eines speziellen Stößels eingebracht.

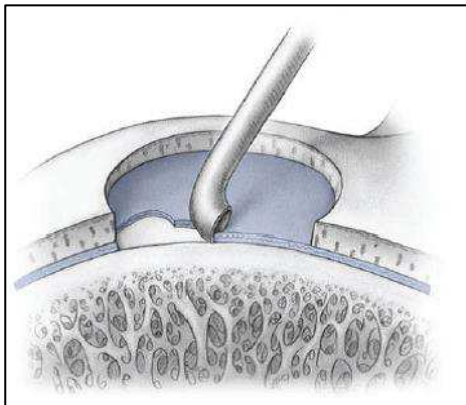


Abbildung 3: Mikrofakturierung - Abtragen des kalzifizierten Knorpels mit einer Kürette (entnommen aus (MITHOEFER et al., 2006))

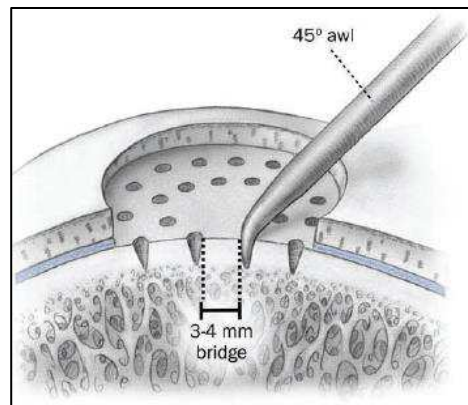


Abbildung 4: Mikrofakturierung - Setzen der Löcher in den subchondralen Knochen mit einem spitzen Stößel (entnommen aus (MITHOEFER et al., 2006))

Wie bei den anderen knochenmarksraumeröffnenden Methoden kommt es zur Bildung eines Fibringerinnsels im Defektgebiet mit einhergehender Gefäßeinsprossung und Einwanderung mesenchymaler Stammzellen und weiterer Heilungsfaktoren. Dieses Verfahren erreichte bislang die besten Ergebnisse unter den knochenmarksstimulierenden Techniken, was die Defektfüllung mit einem Mischgewebe von hyaliner und fibrocartilaginöser Natur angeht (MITHOEFER et al., 2006). Die Kniefunktion konnte in den meisten Fällen in den ersten 24 Monaten effektiv verbessert werden (MITHOEFER et al., 2009). Steadman berichtete über eine signifikante Schmerzreduktion und Verbesserung der Kniefunktion bei 80 % der 71 mit Mikrofakturierung behandelten Patienten selbst nach sieben Jahren. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt bei Patienten, die jünger als 45 Jahre waren (STEADMAN et al., 2003).

Dennoch gibt es auch Belege für ein schlechtes klinisches Ergebnis nach einer Behandlung mit Mikrofakturierung. Gründe dafür waren u.a. eine variable und inkomplette Defektfüllung, die mangelnde hyaline Qualität

des Reparaturgewebes und ein hoher Aktivitätslevel junger Patienten. (KREUZ et al., 2006; MITHOEFER et al., 2009).

3.2.2.3. Abrasionsarthroplastik

Das Prinzip dieser Technik ist dem des Debridements sehr ähnlich. Es werden jedoch nicht nur lose Knorpelfragmente abgetragen und das verbliebene Gewebe etwas geglättet, sondern es werden größere, degenerativ veränderte Knorpelflächen bis in den subchondralen Raum hinein oder sogar bis unter die Kortikalis des darunterliegenden Knochens abgetragen und geglättet. Auch hier kommt es zur Bildung eines anfangs hyalinartigen Knorpelgewebes, welches sich aber langfristig in faserknorpeliges Gewebe umwandelt und späteren degenerativen Prozessen unterliegt (BUCKWALTER & MANKIN, 1998; NEWMAN, 1998). Für eine vorübergehende Verbesserung der Symptome ist es eine geeignete operative Methode. So gelang es mithilfe Abrasionsarthroplastik bei ca. 60% von 73 Patienten mit hochgradiger Arthrose im Kniegelenk eine deutliche Symptomminderung zu erzielen (FRIEDMAN et al., 1984).

3.2.3. Transplantation von Knorpelgewebe

Um die limitierten Heilungschancen von Knorpeldefekten zu überwinden, entwickelte sich die Transplantation ganzer intakter Knorpelstücke. Defekte Knorpelareale werden komplett durch Knochen-Knorpelstücke ersetzt. Die Transplantate können einzeln oder multipel in Form der sog. Mosaikplastik eingesetzt werden, je nach Größe und Lokalisation des Defektes (HANGODY et al., 2001). Das Material kann autogenen oder allogenen Ursprungs sein. Die Vorteile dieser Technik liegen darin, dass eine intakte Knorpelmatrix mit den darin enthaltenen vitalen Chondrozyten transplantiert wird. Diese wiederum tragen zur Aufrechterhaltung der Matrix bei (CZITROM et al., 1990; OUTERBRIDGE et al., 1995).

3.2.3.1. Osteochondrale autologe Transplantation

Indikation für diese Technik sind symptomatische, tiefe, chondrale Knorpeldefekte bis zu 4 cm² Größe in gewichtstragenden Teilen von Gelenknorpeln. Die Patienten sollten nicht älter als 45 Jahre alt sein.

Zunächst wird der Defekt im Knorpel und Knochenbereich mit speziellen Instrumenten zylindrisch ausgestanzt oder ausgebohrt. Danach wird aus weniger belasteten Gelenkgebieten ein gesunder, passgenauer Knorpel-Knochen-Zylinder entnommen und in den Defekt mittels „Pressfit“-Methode eingesetzt, so dass keine weitere Befestigung des Transplantates notwendig ist (BOBIC, 1999; MARLOVITS & VÉCSEI, 2000b). Dies kann bei leicht zugänglichen kleineren Defektgebieten mittels Arthroskopie durchgeführt werden. Bei größeren und posterior gelegenen Knorpelschäden muss aber eine Arthrotomie erfolgen.

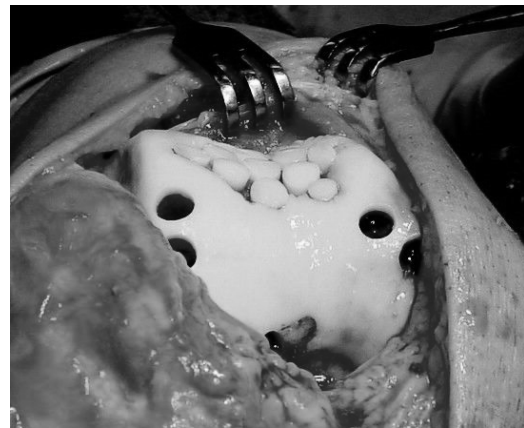
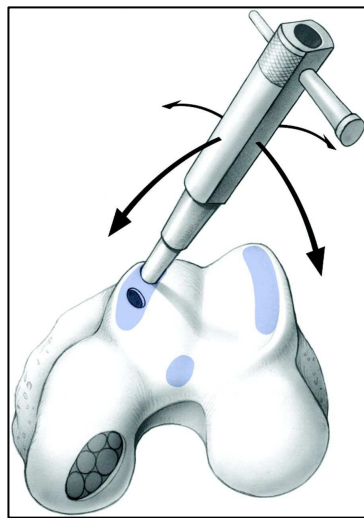


Abbildung 5a und b: a) Schema zur Entnahme der Knorpel-Knochen-Zylinder mithilfe eines Meißels aus den wenig gewichtstragenden Regionen des Gelenkknorpels und Transplantation in die präparierte Empfängerstelle im Kondylus (entnommen aus (BEDI et al., 2010)) b) Darstellung des OP-Feldes während der Mosaikplastik im Kniegelenk in situ (entnommen aus (HANGODY et al., 2001)).

Die Ergebnisse der osteochondralen Transplantation autologer Knorpel-Knochen-Zylinder sind relativ erfolgsversprechend. So wird über eine klinische Verbesserung der auf diese Weise behandelten Patienten von ca. 76-93 % berichtet, jedoch sinkt das gute klinische Resultat mit höherem Alter der Patienten und mit der Größe der Läsion (BRITTBERG et al., 1994; SEO et al., 2011).

Die autologe osteochondrale Transplantation ist die einzige Methode, bei der vitales hyalines Knorpelgewebe ins Defektgebiet eingebracht und erhalten werden kann. Ein entscheidender Vorteil dieser Technik ist die Transplantation intakten Knorpel-Knochen-Gewebes in einem einzigen

Schritt und das Ausbleiben immunologischer Abstoßungsreaktionen. Nachteilig wirken sich die limitierte Verfügbarkeit geeigneter autologer Knorpel-Knochen-Zylinder und eventuell auftretende Beschwerden an den Entnahmestellen aus. Ein weiteres Problem stellt die mangelhafte Integration des Transplantates in den Defekt im Bereich der Knorpelschicht dar. So kommt es im Bereich des Knochens zu einer raschen Einheilung, die Knorpelschicht dagegen verbindet sich nicht mit dem angrenzenden gesunden Knorpel. Es bleibt eine Lücke zwischen Transplantat und umliegendem Knorpel bestehen. Diese Lücken sind in der Mosaikplastik besonders markant. Diese können durch Bildung von Faserknorpel aufgefüllt werden (LANE et al., 1977; MELTON & COSSEY, 2011). Das Ausbleiben der Einheilung des Zylinders in den Defekt führt langfristig zu nutritiven und funktionellen Störungen im Gelenkknorpel und damit zu degenerativen Veränderungen. Darüber hinaus sind Knorpeldicke und Kongruenz an der Entnahmestelle niemals exakt identisch mit denen der Empfängerstelle, was zu Fehlbelastungen und unphysiologischen Gelenksabläufen führen kann (RUDERT & WIRTH, 1998).

3.2.3.2. Osteochondrale allogene Transplantation

Die Verpflanzung von Knochen-Knorpelzylindern ist auch von anderen Spendern möglich. Vorteil gegenüber der autologen Transplantation ist, dass man auch größere Gewebeteile aus den Entnahmestellen extrahieren und großflächige Knorpeldefekte (über 4 cm²) therapieren kann. Von großem Nachteil sind mehrere Faktoren, wie die kurzfristige Verfügbarkeit der Präparate, eine mögliche Immunantwort des Empfängers auf die implantierten Knorpel-Knochen-Zylinder und sogar die Gefahr einer Übertragung von Krankheiten wie HIV oder Hepatitis (CHU et al., 1999).

Trotz der Risiken brachte diese Methode bislang gute klinische Ergebnisse hervor. So zeigte diese Behandlungsart bei verletzungsbedingten Knorpelläsionen die besten Resultate, was Symptomreduktion und funktionelle Beweglichkeit angeht. Bei primärer Arthrose, Osteochondrosis dissecans oder Osteochondronekrose ergaben sich aber keine überzeugenden Effekte (CZITROM et al., 1986).

Langzeitbeobachtungen lieferten gute Ergebnisse in 75 % der Fälle nach fünf Jahren und immer noch in 63 % nach zehn Jahren (BEAVER et al., 1992). Entscheidend für ein gutes postoperatives Ergebnis sind die Qualität und Lagerung des entnommenen Materials des Spenders. So zeigt die Transplantation frischer Knorpel-Knochen-Zylinder zeitnah nach dem Versterben des Spenders bessere Langzeitergebnisse als die Verpflanzung kryokonservierter oder frisch gefrorener Präparate. Grund hierfür ist die rasche Abnahme der Überlebensfähigkeit von Chondrozyten in behandelten und eingefrorenen Zylindern (SHASHA et al., 2003; WILLIAMS et al., 2004). Gründe für ein Versagen des Transplantats sind ein höheres Alter der Patienten, Beinachsenfehler und technische Fehler bei der Transplantation wie eine fehlerhafte Größe oder Dicke, sowie Fehlpositionierung des Transplantats (OAKESHOTT et al., 1988).

Beide Transplantationsarten haben so ihre spezifischen Vor- und Nachteile, die für eine Therapieentscheidung berücksichtigt werden müssen.

3.2.4. Transplantation von Zellen

Neben der Transplantation ganzer intakter Knorpel-Knochenstücke gibt es die Möglichkeit, autologe Zellen zu isolieren, unter Laborbedingungen zu vermehren und in den Knorpeldefekt zu implantieren. Als Zellen kommen sowohl Chondrozyten als auch multipotente, mesenchymale Stammzellen in Frage.

3.2.4.1. Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT)

In der Klinik findet diese Methode seit den neunziger Jahren Anwendung. Zur Therapie von Patienten mit chondralen Knorpeldefekten im Knie wurden damals arthroskopisch Knorpelstücke aus wenig belasteten Regionen des Gelenks entnommen. Im Labor wurden daraus Chondrozyten isoliert und *in vitro* kultiviert und vermehrt. Zwei bis drei Wochen später wurden die Knorpelzellen innerhalb einer Suspension in den Defekt transplantiert. Dazu wurde ein Periostlappen über den Defekt genäht, dieser an den Rändern mit Fibrinkleber abgedichtet und die Chondrozytensuspension darunter eingespritzt. Nach zwei Jahren zeigten sich bei vierzehn der insgesamt sechzehn Patienten gute bis sehr gute

klinische Resultate (BRITTBERG et al., 1994).

Klassischerweise ist diese Technik bei symptomatischen Knorpeldefekten im Kniegelenk mit einer Größe von 2,5 bis 10 cm² als Sekundärtherapie nach der erfolglosen Erstintervention durch knochenmarksstimulierende Methoden indiziert. Im Gegensatz zu letztgenannten erreicht man mittels ACT die Bildung eines hyalinartigen und nicht eines faserknorpeligen Reparaturgewebes (MINAS et al., 2010; BATTY et al., 2011).

Die Technik hat sich seit den Anfängen der ACT bzw. ACI (autologous chondrocyte implantation) nicht viel geändert. Nach wie vor werden in einem ersten operativen Schritt ca. 200-300 mg Knorpelgewebe entnommen, Zellen durch enzymatischen Verdau daraus isoliert und drei bis sechs Wochen *in vitro* kultiviert. Im zweiten Schritt werden die vermehrten Knorpelzellen in Form einer Suspension in den kürettierten und geglätteten Defekt reimplantiert. Bei der Vorbereitung des Defektes ist darauf zu achten, den subchondralen Knochen nicht zu verletzen, da eine Einblutung in den Defekt das Risiko einer Entstehung von Faserknorpel erhöhen soll (MINAS & PETERSON, 1999). Ursprünglich wurden zur Fixation der Chondrozytensuspension autologe Periostlappen über den Defekt genäht und geklebt, mittlerweile sind auch synthetische Membranen aus Kollagen im Gebrauch (COLE et al., 2009).

Die kurz- bis mittelfristigen klinischen Ergebnisse sind gut bis sehr gut. Beispielsweise konnte bei 83,6 % von 61 mit ACI behandelten Patienten mit isolierten, tiefen chondralen Knorpeldefekten im Knie, eine gute bis exzellente klinische Verbesserung nach 7,4 Jahren festgestellt werden (PETERSON et al., 2002). Langzeitergebnisse stehen allerdings noch aus.

Die häufigsten Komplikationen dieser Therapiestrategie sind zum einen eine Hypertrophie des Transplantats, welche durch mechanische Stimulation des Periostlappens hervorgerufen werden kann, besonders wenn dieser an den geklebten Rändern etwas absteht. In diesem Fall ist ein erneuter chirurgischer Eingriff notwendig (COLE & D'AMATO, 2001).

Nach der Operation ist ein striktes, mehrmonatiges Rehabilitationsprogramm notwendig, was eine hohe Therapieadhärenz

der Patienten erforderlich macht. Ein weiterer Nachteil sind der doppelt nötige chirurgische Eingriff und die hohen Kosten (SEO et al., 2011).

3.2.4.2. Matrix-Assoziierte Chondrozyten Transplantation (MACT)

Sie stellt eine Weiterentwicklung der klassischen ACT dar. Der Unterschied hierzu ist die Besiedelung eines biodegradierbaren Trägermaterials, meist einer porzinen, porösen Kollagen I/III-Membran, mit *in vitro* kultivierten autologen Knorpelzellen. Die Matrix mit den Chondrozyten wird dann passgenau in den Defekt eingenäht oder mit Fibrinkleber befestigt, ohne dass ein Periostlappen zur Fixierung nötig ist (BARTLETT et al., 2005).

Die Kollagen Typ I/III – Matrix hat sich als ideales Material für das Aussäen der Knorpelzellen erwiesen. Die Chondrozyten heften sich zunächst oberflächlich an die Membran an. Dabei behalten sie ihren chondrozytären Phenotyp, proliferieren und migrieren in den gesamten Defekt (FUSS et al., 2000).

Das Reparaturgewebe ist von hyalinähnlicher Knorpelkonsistenz, d.h. es weist einen hohen Kollagen Typ II Anteil auf, ist gut in den Defekt integriert und füllt diesen aus (MARLOVITS et al., 2005; TRATTNIG et al., 2005). Durch die MACT-Technik lassen sich daher gute bis sehr gute klinische Ergebnisse erzielen mit signifikanter Schmerzreduktion für 72% der so behandelten Patienten (BARTLETT et al., 2005). Diese Ergebnisse sind bis zu fünf Jahre nach erfolgter Behandlung nachweisbar (BEHRENS et al., 2006).

Diese Prozedur stellt für mittlere bis große Knorpeldefekte, gerade bei jungen und athletischen Patienten, eine sinnvolle Option dar. Sie erfolgt zudem arthroskopisch, d.h. minimal invasiv. Dennoch sind insgesamt zwei Eingriffe nötig – den ersten, um die Chondrozyten zu gewinnen, und einen zweiten, um die Matrix mit den Knorpelzellen in den Defekt zu implantieren. Von entscheidendem Nachteil der MACT ist neben der Belastung durch die zwei chirurgischen Eingriffe für den Patienten die kostenintensive, lange Kultivierungszeit der Chondrozyten von vier bis sechs Wochen in einem GMP-zertifizierten Labor (BRITTBERG, 2010).

4. Regenerative Therapiestrategien: Tissue Engineering

Für die zuvor beschriebenen Verfahren zur Behandlung von Knorpeldefekten lässt sich zusammenfassen, dass bislang keine schnelle, intraoperative und damit kostengünstigere Methode existiert, um Knorpelgewebe vollständig und langfristig zu regenerieren. Daher gibt es in der Wissenschaft große Bemühungen, solch eine Therapiemöglichkeit zu entwickeln - mithilfe des sogenannten Tissue Engineerings.

Ziel dieses Verfahrens ist es, durch die interdisziplinäre Verknüpfung von zell- und molekularbiologischen Ansätzen mit Biomaterialwissenschaften, den physiologischen Zustand eines verletzten Gewebes wiederherzustellen, aufrechtzuerhalten und zu verbessern (LANGER, 2000). Ein frühes Beispiel hierfür stellt die bereits dargestellte und klinisch etablierte matrix-assoziierte Chondrozytentransplantation (MACT) dar, die durch Kombination kultivierter, autologer Knorpelzellen mit einer geeigneten Trägersubstanz versucht, Knorpeldefekte mit zumindest knorpelähnlichem Gewebe auszufüllen.

Neue experimentelle Konzepte des Tissue Engineerings zielen darauf ab, durch geeignete Auswahl von Zellen, Optimierung von Trägermaterialien (Scaffolds), genetische Modifikation von Zellen und Verwendung von knorpelassoziierten Wachstumsfaktoren eine Regeneration von Knorpelgewebe zu erreichen (JOHNSTONE et al., 2013).

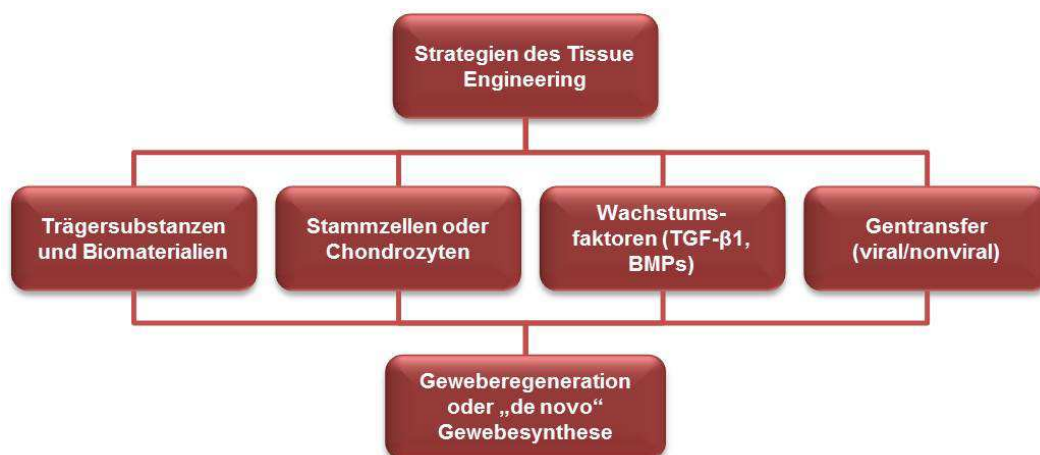


Abbildung 6: Strategien im Tissue Engineering zur Knorpelregeneration

4.1. Zelltypen

4.1.1. Chondrozyten

Als Quelle für die Gewinnung von Zellen zur Knorpelregeneration kommen grundsätzlich Chondrozyten oder adulte, mesenchymale Stammzellen in Frage. Die Entnahme autologer Chondrozyten und deren Kultivierung im Labor stellt die bislang einzig klinische Methode dar. Das minimale Risiko immunologischer Reaktionen und die hohe Syntheserate extrazellulärer Matrixkomponenten, Kollagen Typ II und Aggrecan sind als deutliche Vorteile des Verfahrens zu nennen. Zu den großen Nachteilen der Knorpelzellgewinnung zählen allerdings der damit verbundene invasive Eingriff, um Zellen aus gesundem Knorpelgewebe zu entnehmen, und die begrenzte Verfügbarkeit von Zellen (GIANNONI & CANCEDDA, 2006; KESSLER & GRANDE, 2008). Während der *in vitro* Kultivierungsphase kommt es zudem zu einer Dedifferenzierung der Knorpelzellen hin zu fibroblastenartigen Zellen, die in Kauf genommen wird (GLOWACKI et al., 1983; SCHNABEL et al., 2002). Erst nach Ausbringen dieser Zellen auf geeignete dreidimensionale Trägermaterialien findet die Redifferenzierung zum chondrozytären Typ statt, wobei die Zellen ihre Teilungsrate reduzieren (JOHNSTONE et al., 2013).

Möchte man diese Problematik umgehen, stellt die Verwendung adulter mesenchymaler Stammzellen (MSCs) eine Alternative dar. Dies ist bislang noch in der experimentellen Phase.

4.1.2. Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

Mesenchymale Stammzellen haben multipotente Eigenschaften. Sie spielen eine wichtige Rolle für die Hämatopoese und können sich in zahlreiche Gewebe wie Knochen, Knorpel, Sehne, Muskel, Fett oder Haut differenzieren. Daher sind diese Zellen essenziell für Reparatur- und Regenerationsprozesse. MSCs migrieren an den Ort des Defektes und differenzieren sich dort durch die Einwirkung spezifischer Wachstumsfaktoren und Zytokine zu bestimmten Zelllinien. In Folge der Differenzierung beginnen die Zellen, gewebespezifische, extrazelluläre Matrixkomponenten zu produzieren. Am Ende der Reifung stehen erwachsene Zellen, die die zellulären Funktionen in dem bestimmten

Gewebe erfüllen (CAPLAN, 2000).

Durch die Eigenschaft mesenchymaler Stammzellen, sich in Knorpelzellen verwandeln zu können, besteht grundsätzlich die Möglichkeit, MSCs auch in der Behandlung von größeren Knorpeldefekten einzusetzen. Sie sind relativ gut zugänglich, da sie in zahlreichen Gewebearten vorhanden sind, wie im Knochenmark, Fettgewebe, Muskel, Periost oder Synovium. Studien der vergangenen Jahrzehnte zeigten, dass aus diesen Gewebearten Stammzellen isoliert und durch Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β , BMP-2/4) und Zytokinen in den chondrozytären Phänotypus differenziert werden können (SAKAGUCHI et al., 2005; GUILAK et al., 2010). Sie behalten ihre multipotenten Eigenschaften über mehrere Kultivierungspassagen hinweg. Eine Studie an Kaninchen lieferte sehr gute Ergebnisse hinsichtlich der Defektfüllung (WAKITANI et al., 1994). Allerdings ist die Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus den genannten Geweben ein aufwendiges und kostenintensives Unterfangen, was einen künftigen klinischen Gebrauch erschweren mag (BETZ et al., 2008).

4.2. Trägersubstanzen

Neben der klinisch bereits verwendeten Kollagen Typ I/III-Matrix befinden sich weitere biologische als auch synthetische Materialien in der Erprobung. Als natürliche Biomaterialien zeigten Hyaluronsäure-basierte Polymere, als auch Agarose, Alginat oder Kollagen Typ I-Gele erste Erfolge (RUDERT & WIRTH, 1998; DE FRANCESCHI et al., 2005). Synthetisch hergestellte Polymere umfassen neben PLA (poly lactic acid), PGA (poly glycolic acid) (VACANTI et al., 1991) auch Poly- ϵ -Caprolacton (UPPANAN et al., 2014) und Hydrogele (SLAUGHTER et al., 2009).

Alle Trägersubstanzen müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen, damit sich Zellen ansiedeln und vor allen Dingen vital bleiben können (FREED et al., 1993; RAGHUNATH et al., 2007):

- die Oberfläche des Materials muss das Anheften und Wachsen von Zellen ermöglichen
- es darf keine Entzündungsreaktion durch das Konstrukt *in vivo* entstehen

- das Konstrukt muss von dreidimensionaler Gestalt sein
- die Porosität muss groß genug sein, so dass sich Zellen anheften und vermehren, Blutgefäße problemlos einwachsen können und die Diffusion von Nährstoffen möglich ist
- die Matrix muss resorbierbar sein und maßgeschneidert zur Neubildung körpereigenen Knorpels allmählich degradieren
- eine gewisse Stabilität gewährleisten, um ungestörtes Zellwachstum zu sichern.

Viele der getesteten Materialien zeigten *in vitro* und *in vivo* sehr unterschiedliche Ergebnisse (KANDEL et al., 2006; KON et al., 2009). Bei PGA- bzw. PLG-Polymeren ist eine tendenziell höhere Knorpelzellproliferation festzustellen als bei Kollagenvliesen (TULI et al., 2003). Als Komplikationen sind eine zu schnelle Degradation des Materials oder Fissurenbildung am entstandenen knorpelähnlichen Gewebe beispielhaft anzuführen (SHAO et al., 2006). Bis zum heutigen Zeitpunkt hat sich keines dieser Materialien als optimal herausgestellt.

4.3. Wachstumsfaktoren: Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

1965 entdeckte Urist die Bedeutung bestimmter Proteine für die Regeneration von Knochen und nannte diese *bone morphogenetic proteins* (URIST & STRATES, 2009). Darauf folgende Studien zeigten, dass BMPs nicht nur in der Knochenformation eine Rolle spielen, sondern auch in zahlreichen anderen Geweben für die Differenzierung von Zellen zu bestimmten Zelltypen verantwortlich sind, so auch für die Entwicklungskaskade von Chondrozyten im Rahmen der Knorpelbildung (REDDI, 2005).

BMPs gehören zu der TGF (*transforming growth factor*)- β -Superfamilie und spielen bereits in der embryonalen Entwicklung vieler Organe eine große Rolle. Bislang wurden BMP-2 bis BMP-18 identifiziert mit verschiedenen physiologischen Funktionen (CHEN et al., 2004). Für die Induktion von Knorpelgewebe sind hauptsächlich BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMP-13 und 14 verantwortlich. Die letzten beiden werden auch *cartilage derived morphogenetic proteins* genannt, da ihre Wirkweise eher den

chondrogenen als den osteogenen Zellphenotyp begünstigt (REDDI, 2003).

Alle BMPs binden an Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, was spezifische intrazelluläre Mechanismen triggert und letztlich die Transkription bestimmter Genabschnitte stimuliert (BESSA et al., 2008).

Am ausführlichsten untersucht sind bislang BMP-2 und -7, wobei sie in unterschiedlicher Weise auf Chondrozyten und MSCs wirken. BMP-2 stimuliert *in vitro* hauptsächlich die Produktion der extrazellulären Matrix, d.h. die Proteoglykansynthese von Chondrozyten und die Produktion von Kollagen Typ II und Aggrecan (SAILOR et al., 1996). Mesenchymale Stammzellen werden in Kultur unter Einwirkung von BMP-2 zur chondrogenen Zelldifferenzierung gebracht und zu vermehrter Proliferation und Synthese der extrazellulären Matrix angeregt (SCHMITT et al., 2003). BMP-7 wirkt *in vitro* ebenfalls auf die vermehrte Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten hin und hemmt darüber hinaus Knorpelabbauvorgänge durch Minderung der Aktivität von Matrix-Metallo-Proteinasen und Interleukinen (ELSHAIR et al., 2009). MSCs werden durch BMP-7 allein allerdings wohl nur inkonsistent zur chondrozytären Differenzierung angeregt und die Zellproliferation wird sogar gehemmt. Nur in Kombination mit TGF- β 3 konnte eine chondrogene Differenzierung von MSCs stattfinden (SHEN et al., 2010).

In vivo konnte im Kaninchenmodell durch den Einsatz von rekombinantem BMP-2 eine beschleunigte Knorpelheilung und ein verbessertes histologisches Resultat gegenüber unbehandelten Defekten erreicht werden. Verabreicht wurde das Protein über Kollagenschwämme, die in osteochondrale Defekte eingebracht wurden (SELLERS et al., 1997). Die Therapie chondraler Defekte im Kniegelenk im Schaf mithilfe von rekombinantem, humanem BMP-7, das mittels einer mini-osmotischen Pumpe subsequent über zwei Wochen in den Defekt appliziert wurde, ergab, dass das neu gebildete Knorpelgewebe gut in den umliegenden Knorpel integriert war und immunhistochemisch als auch biochemisch hyalinem Knorpel ähnelte. Unbehandelte Defekte blieben im Beobachtungszeitraum von sechs Monaten hingegen leer (JELIC et al.,

2001).

In klinischer Anwendung befinden sich momentan die rekombinanten Versionen von BMP-2 und BMP-7 (rhBMPs), die mithilfe von resorbierbaren Kollagenschwämmen zur Fusion von Wirbelkörpern und zur Heilung großer Knochenfrakturen eingesetzt werden (MCKAY et al., 2007). Gewonnen werden diese rhBMPs durch Klonierung der BMP-Genabschnitte und deren Transkription und Expression in Säugetierzellen. Dadurch erzeugt man aktive Metaboliten, deren Ertrag aber im Vergleich zu einem bakteriellen Produktionssystem in *E. coli*-Stämmen sehr gering und die Herstellung sehr kostenintensiv ist (BESSA et al., 2008).

Die positive Wirkung von BMPs auf Knorpelheilung ist unbestritten, jedoch bleibt die Frage, wie diese Wachstumsfaktoren kontrolliert, in ausreichender Menge und über einen genügend langen Zeitraum auf den verletzten Knorpel wirken können. Ein Problem stellt nämlich die kurze Halbwertszeit der Proteine bei Körpertemperatur dar. So konnte Sellers eine mittlere Eliminations-Halbwertszeit des rhBMP-2 von 5,6 Tagen nach Einsetzen des Kollagenschwamms nachweisen (SELLERS et al., 2000). Eine Lösung dieses Problems könnte in gentherapeutischen Ansätzen liegen.

4.4. Gentherapie

4.4.1. Methodik des Gentransfers

Um die Hürde der kurzen Wirkzeit der Wachstumsfaktoren zu überwinden, gibt es erste experimentelle Ansätze aus dem Gebiet der Gentherapie. Dies bedeutet, dass bestimmte DNA-Abschnitte, die die gewünschten Proteine kodieren (cDNA), über non-virale als auch virale Vektoren in Zellen, beispielsweise Chondrozyten, eingeschleust werden. Die Zellen sollen so befähigt werden, Wachstumsfaktoren selbst, in ausreichend hoher therapeutischer Menge und über einen längeren Zeitraum zu produzieren. Es besteht prinzipiell die Möglichkeit, die Zielzellen *ex vivo* nach Isolation und Kultivierung im Labor oder *in vivo* durch direkte Gelenksinjektion des gencodierenden Vektors zu transduzieren. Obwohl der *in vivo* Ansatz wohl der schnellere und einfachere Weg des Gentransfers ist, handelt es sich bei dem *ex vivo* Verfahren um die

sicherere Methode, da die Genmanipulation außerhalb des Körpers und somit kontrolliert erfolgen und die genmodifizierten Zellen vor Reimplantation *in vitro* getestet werden können (ADACHI et al., 2001). In dieser Studie wurde eine modifizierte Art der *ex vivo* Strategie, nämlich die Transduktion von Zellen innerhalb des Muskelgewebes ohne zusätzliche Isolation und Kultivierung von Zellen, untersucht.

4.4.2. Vektoren

Vektoren werden benötigt, um die proteinkodierenden Gene in die Zielzellen zu schleußen. Erforscht wurden bislang eine Reihe verschiedener Vektoren, wobei man zwischen viralen und nicht viralen unterscheidet.

Zu den viralen Vektoren gehören Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren und das Herpes simplex-Virus. Für die Knorpelregeneration haben sich Adenoviren als besonders geeignet erwiesen, da sie sehr effizient sind (STEINERT et al., 2008). Retroviren benötigen zur Transduktion des Gens teilende Zellen und sind potentiell mutagen, da ihr Genom in das der Wirtszelle inkorporiert wird (NIXON et al., 2007). Mit Adeno-assoziiertem viralen Gentransfer werden nur sehr kleine Mengen an Transgen produziert und diese Vektoren sind sehr schwierig in ihrer Herstellung (PAN et al., 2000). Der Herpes simplex-Virus hat sich als Vektor äußerst zytotoxisch gezeigt (MARCONI et al., 2008).

Nicht virale Vektoren, wie Liposome oder nackte DNA sowie Elektroporationsverfahren, haben sich als weniger geeignet für den Gentransfer erwiesen, da sie eine zu niedrige Transduktionsrate von Zellen aufweisen und ihr Einsatz somit nicht effizient ist (MADRY & TRIPPEL, 2000).

4.4.3. Adenoviren in der Gentherapie

Rekombinante humane Adenoviren sind durch meist mehrere Deletionen bestimmter viraler Genomabschnitte so verändert, dass sie sich in der Wirtszelle nicht weiter replizieren können. Das adenovirale, replikationsdefekte Genom wird nicht in die DNA der Zielzelle integriert, sondern liegt extrachromosomal im Zellkern der Wirtszelle vor (KAY et al., 2001). Das in die virale DNA integrierte Transgen, z.B. für die Bildung

gewünschter Wachstumsfaktoren, wird demnach solange exprimiert, solange das Episom (= extrachromosomale virale DNA) in der Wirtszelle vorhanden ist. Dieses wird mit der Zellteilung im Gegensatz zur Zell-DNA nicht an die nachfolgende Zellgeneration weitergegeben. Daher endet entweder mit dem Verlust des viralen Episoms oder mit dem Zelltod der Wirtszelle die Transgenexpression und die Konzentration der erzeugten Proteine sinkt, was im Rahmen der Gentherapie auch langfristig gewünscht ist (CAO et al., 2004). Darüber hinaus können Adenoviren sowohl mitotische als auch sich nicht teilende Zellen mit hoher Effektivität transduzieren und lassen sich *in vitro* in hohen Konzentrationen anreichern. Der größte Nachteil in der Anwendung von Adenoviren besteht in der Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort, sowohl gegen den Vektor, als auch gegen die mit dem Vektor transduzierte Zelle (MCCONNELL & IMPERIALE, 2004). Dieser immunogene Effekt ist aber bei Adenoviren der neueren Generation durch Elimination der meisten viralen Gene stark zurückgegangen (SCHIEDNER et al., 1998; ADACHI et al., 2001).

In vielen präklinischen Studien zur Transduktion von Chondrozyten und Therapie osteochondraler Knorpeldefekte wurde der adenovirale Gentransfer bereits durchgeführt. So wurden Monokulturen von Kaninchen-Chondrozyten mit einem rekombinanten Adenovirus, welches die Gene für die Wachstumsfaktoren insulin-like growth factor (IGF-1), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) und BMP-2 kodiert, erfolgreich transduziert. Die Expression aller Transgene war nach Transduktion sehr stark und die Konzentration extrazellulärer Matrixkomponenten war in der transduzierten Zellkultur deutlich erhöht. In Zellkulturen unter Anwesenheit des produzierten BMP-2 zeigte sich sogar ein achtfach höherer Proteoglykangehalt als in Kontrollzellkulturen (SMITH et al., 2000). Eine Studie im Pferdmodell zeigte eine verbesserte und schnellere Defektheilung von osteochondralen Knorpelläsionen, nachdem mit BMP-7 adenoviral transduzierte Chondrozyten über eine autologe Fibrinmatrix in den Defekt implantiert wurden. Dieser Effekt hielt bis zu acht Monaten an, danach sank das Kollagen Typ II-Niveau und der Proteoglykangehalt auf das Level der Kontrollgruppe (HIDAKA et al., 2003).

4.4.4. Muskelgewebe und Gentransfer

Wie bereits erörtert, sind mesenchymale Stammzellen aufgrund ihrer multipotenten Differenzierungsmöglichkeit eine gute Alternative zu Chondrozyten, wenn es um eine Zelltherapie von osteochondralen Defekten geht. Unter dem Einfluss bestimmter Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise BMP-7, entwickeln sich MSCs zum chondrozytären Phenotypus (BAI et al., 2011). Genau wie Knorpelzellen können auch MSCs erfolgreich mit Wachstumsfaktoren adenoviral transduziert werden und für Heilungsansätze zur Knorpelregeneration verwendet werden (PARK et al., 2006). Der Vorteil der Genübertragung für die Expression von chondrogenen Wachstumsfaktoren auf MSCs liegt darin, dass zum einen eine dauerhafte und effiziente Produktion der gewünschten Proteine erreicht werden kann und zum anderen, sich die MSCs unter dem Einfluss dieser Faktoren gleichzeitig chondrozytär differenzieren lassen (CAPLAN, 2000). Neben Knochenmark, Periost oder Fettgewebe stellt auch Muskelgewebe eine ergiebige Quelle zur Gewinnung von Stammzellen dar. In einigen Studien wurden Stammzellen im Muskelgewebe, sog. *muscle derived stem cells (MDSCs)*, identifiziert und deren multiple Differenzierungseigenschaften, insbesondere in die chondrogene Zelllinie, untersucht (KURODA et al., 2006). Die Implantation von autologen, mit Beta-Galactosidase (LacZ) retroviral transduzierten MDSCs in osteochondrale Defekte im Kaninchen resultierte in verbesserter Integration des Reparaturgewebes und in einen höheren Kollagen Typ II-Gehalt im Vergleich zur Chondrozyten-Kontrollgruppe (ADACHI et al., 2002). Voraussetzung für den Einsatz von Muskelgewebe für den Gentransfer ist bislang jedoch, dass diese Stammzellen erst mühsam isoliert und mehrere Wochen kultiviert werden müssen, bevor sie transduziert und schließlich reimplantiert werden können. Dies macht das Verfahren zeit- und kostenaufwendig (EVANS et al., 2007).

5. Tiermodell

Die Studie wurde an ausgewachsenen, weiblichen Merinolandschafen durchgeführt. Das Schaf ist, im Gegensatz zu Kaninchen oder Ratte, wie der Mensch ein langsamer Knorpelbildner und weist, was Anatomie und Größe der beteiligten Strukturen im Kniegelenk angeht, die größte

Ähnlichkeit zum Menschen auf (AHERN et al., 2009; OSTERHOFF et al., 2010). Ein geeignetes Tiermodell sollte zudem die beim Menschen auftretenden biomechanischen Belastungen gut simulieren können, was beim Schaf der Fall ist. Dessen Hinterläufe weisen, im Vergleich zum oft in der Knorpelforschung verwendeten Kaninchen, eine geringere Flexionshaltung und damit eine dem Menschen sehr nahe kommende Belastungssituation auf (BRUNS et al., 1992; ALLEN et al., 1998). Der ovine Knorpel ähnelt damit dem des Menschen in Anatomie und Größenverhältnissen beteiligter Strukturen im Kniegelenk sowie in seiner Regenerationsfähigkeit (JANSSON et al., 2000; MARTINI et al., 2001). Ein Unterschied besteht allerdings in der Knorpeldicke. Im Durchschnitt beträgt der Knorpeldurchmesser des Schafes im Kniegelenk 0,4-0,5 mm, beim Menschen liegt er aber bei 2,2-2,5 mm (FRISBIE et al., 2006a). Im Vergleich zum Kaninchen, das mit einer mittleren Knorpeldicke im Kniegelenk von nur 0,3 mm einen noch geringeren Wert aufweist, entspricht der ovine Knorpel den humanen Verhältnissen somit eher. Insgesamt stellt das Schaf ein gemeinhin akzeptiertes und etabliertes Tiermodell in der orthopädischen Forschung dar.

6. Aufgabenstellung

Aufgrund der dargestellten Problematik, mithilfe aktueller klinischer Therapiestrategien eine dauerhafte Heilung chondraler als auch osteochondraler Knorpeldefekte zu erreichen, kommt den ersten *in vitro* und *in vivo* Therapieansätzen aus dem Gebiet des Tissue Engineerings eine besondere Bedeutung zu. Ein essentieller Bestandteil des Tissue Engineerings zur Knorpelregeneration sind chondrogene Wachstumsfaktoren, wie z.B. BMP-2. Gezielter Gentransfer kann bewirken, dass diese Wachstumsfaktoren lokal, über einen längeren Zeitraum hinweg, in gerade ausreichenden, therapeutischen Mengen freigesetzt werden. Außerdem hat sich gezeigt, dass Proteine, die von gentechnisch veränderten, körpereigenen Zellen freigesetzt werden, eine bessere biologische Wirkung aufweisen, als die oben erwähnten rekombinanten Wachstumsfaktoren, wie z.B. das in der Knochenheilung verwendete rhBMP-2 oder rhBMP-7 (SCADUTO & LIEBERMAN, 1999; EVANS et al., 2004). Zahlreiche Gentransfermethoden wurden erfolgreich

in vorklinischen Untersuchungen getestet. Die meisten dieser Verfahren sind aber sehr aufwendig und kostenintensiv, da sie die Isolierung und Kultivierung von Zellen erfordern und daher für den klinischen Einsatz ein Hindernis darstellen (EVANS et al., 2007).

Das Ziel dieser Dissertation war es, einen vereinfachten *ex vivo* Ansatz zur adenoviralen Transduktion eines geeigneten Trägermaterials, in diesem Falle von autologem Muskelgewebe mit anliegender Faszie, zu untersuchen. Der Gentransfer fand noch während der Operation außerhalb des Körpers in einer 12-Well-Platte statt, wobei kein vorheriges Isolieren und Kultivieren von Zellen notwendig war, da intakte ganze Gewebestücke verwendet wurden. Das BMP-2-Gen wurde dabei auf die an der Oberfläche liegenden Zellen der Muskelfaszientransplantate übertragen. Das so aktivierte Gewebe wurde darauf in einen geschaffenen, chondralen Knorpeldefekt kritischer Größe (Durchmesser 8 mm) implantiert. Der Wachstumsfaktor BMP-2 sollte nun im Defekt über einen begrenzten Zeitraum von den genmodifizierten Muskelzellen produziert werden und so eine Knorpelheilung anregen. Erste Versuche dieser Methode an Ratten und Kaninchen an der Harvard Medical School (Boston, Massachusetts) zeigte makroskopisch und histologisch eine Regeneration osteochondraler Defekte (EVANS et al., 2007; EVANS et al., 2009).

In dem hier dargestellten Tierexperiment sollte erstmals untersucht werden, ob BMP-2-genaktivierte Muskelfaszientransplantate in Kombination mit einem knochenmarksstimulierenden Behandlungsverfahren (Pridie-Bohrung) chondrale Knorpeldefekte in einem mit dem Menschen vergleichbaren Großtiermodell (Schaf) verlässlich und biomechanisch stabil heilen können.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- 1.) Kann durch die angewendete Therapiemethode eine Defektheilung erreicht und ein Regenerat erzeugt werden, das histologisch, immunhistochemisch und biomechanisch hyalinem Knorpelgewebe gleicht?
- 2.) Wie unterscheiden sich die Heilungsergebnisse von Ad.BMP-2

behandelten, mit nativem, autologem Muskelfasziengewebe versorgten und unbehandelten Defekten hinsichtlich, makroskopischen, biomechanischen und histologischen/immunhistochemischen Kriterien?

- 3.) Wie unterscheiden sich die Heilungsergebnisse von behandelten und unbehandelten Defekten nach einer Standzeit von 24 Wochen gegenüber einer Standzeit von 16 Wochen?
- 4.) In welcher Menge und über welchen Zeitraum wird der Wachstumsfaktor BMP-2 in transduziertem, ovinem Muskelfasziengewebe *in vitro* produziert?

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Vektor und BMP-2

Für die Transduktion der Zellen im extrahierten Muskelgewebe wurde ein E1/E3-deletiertes humanes Adenovirus vom Serotyp 5 als Vektor verwendet. Durch Entfernen der E3- und E1-Region wurde dem Virus die Fähigkeit zur eigenständigen Vermehrung entzogen. Anstelle der E1-Region befand sich die BMP-2 kodierende cDNA.

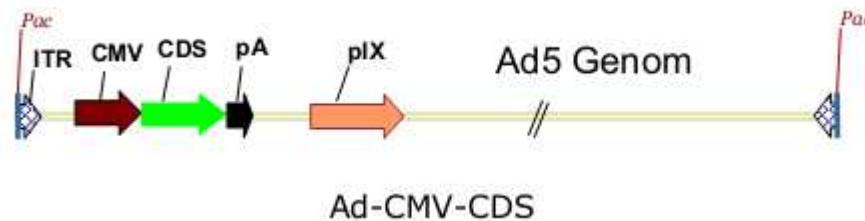


Abbildung 7: E1/E3 – deletiertes humanes Adenovirus, Serotyp 5

Eine Transkriptionskassette bestehend aus dem CMV (Cytomegalie-Virus)-Promoter, dem kodierenden Bereich von CDS und dem SV40 Polyadenylierungssignal (pA) wurde in ein Shuttle Plasmid kloniert. Durch Rekombination zwischen dem Shuttle Plasmid und einem BAC-Vektor mit einem E1/E3-deletierten AV5 Genom entstand der Adenovirus-Expressionsvektor pAd-CMV-CDS¹, ein E1/E3 deletierter humaner Adenovirus-Vektor, der die adenoviralen Sequenzen, nt 1-448 und 3511-35935 mit einer vollständigen Deletion der E3 Region nt 28598-30470 bezogen auf Ad5 wt enthielt. Durch Restriktion der BAC-DNA mit Pac1 wurde das adenovirale Genom freigesetzt und daraus durch Transfektion von HEK293 Zellen intakte adenovirale Partikel gewonnen.

¹ Hergestellt durch SIRION Biotech GmbH, Martinsried

1.2. Tier und Tierhaltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um zwei- bis dreijährige weibliche Merinolandschafe mit einem Durchschnittsgewicht von 66,7 kg. Bei der Auswahl der Schafe wurde darauf geachtet, ausschließlich ausgewachsene und nicht-trächtige Tiere zu verwenden. Es erfolgte zudem eine ausführliche Allgemeinuntersuchung inklusive Adspektion und Palpation der Gliedmaßen, um einen tadellosen Gesundheits- und Pflegezustand der Schafe zu sichern.



Abbildung 8: Merinoschafe in der Versuchstiereinrichtung

Während der Versuchsdurchführung waren die Schafe in speziellen Tierhaltungsräumen im Zentrum für Präklinische Forschung, Klinikum rechts der Isar, untergebracht. In den 3 m² bzw. 6 m² großen eingestreuten Buchten wurden maximal zwei bzw. vier Tiere gleichzeitig gehalten, wobei alle Tiere stets Sichtkontakt zueinander hatten. Die Fütterung erfolgte mit speziellem Schaffutter ad libitum (Heu und Silage des Herkunftsbetriebes sowie handelsübliche Pellets). Frisches Leitungswasser war über automatische Tränken jederzeit verfügbar. Die Haltung der Tiere unterlag den in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen. 24 Stunden vor der Narkoseeinleitung wurden die Tiere nüchtern gehalten. Wasser stand bis kurz vor der OP ad libitum zur Verfügung.

Die externe Haltung im Herkunftsbetrieb war ab einer postoperativen Beobachtungszeit von ca. sieben Tagen vorgesehen, sofern die Tiere ein gutes Allgemeinbefinden aufwiesen und transportfähig waren. Dort wurden die Tiere in einem separaten Versuchstierstall gehalten und mit Futter aus eigener Herstellung versorgt. Im weiteren Verlauf wurden die Tiere regelmäßig tiermedizinisch untersucht.

Versuchsgruppen

Die Einteilung erfolgte in fünf Gruppen:

1. Gruppe **L (120)**: Chondrale Leerdefekte, mit Pridie-Bohrung (PB), n=7, Standzeit 120 Tage
2. Gruppen **M (120)** (n=7) und **M (180)** (n=6): Chondrale Knorpeldefekte, mit PB und unbehandelten, autologen Muskelfaszientransplantaten, Standzeit 120 Tage bzw. 180 Tage
3. Gruppen **M Ad.BMP-2 (120)** (n=7) und **M Ad.BMP-2 (180)** (n=14): Chondrale Defekte, mit PB und BMP-2 genmodifizierten, autologen Muskelfaszientransplantaten, Standzeit 120 Tage bzw. 180 Tage

Zum Vergleich wurden bei jedem Tier Knorpelproben des medialen Kondylus des kontralateralen gesunden Knies als Nativkontrolle herangezogen. Alle Tiere wurden nach einer Standzeit von 120 bzw. 180 Tagen tierschutzkonform euthanasiert.

Ein Tier der Gruppe **M (180)** musste aufgrund seines sehr schlechten Allgemeinbefindens und schließlich infauster Prognose einen Tag post operationem euthanasiert werden. Daher reduzierte sich die Gruppengröße auf n=6.

Für den Versuch lag die Genehmigung des Amtes für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz der Regierung Oberbayern (AZ: 55.2-1-54-2532-139-11) vor.

1.3. Autologe Muskelgewebestücke

Um die geschaffenen chondralen Defekte zu verschließen, wurde dem operierten Tier Muskelgewebe inklusive anliegender Faszie aus der oberflächlichen, das Kniegelenk umgebenden Muskulatur mittels einer

Hautbiopsiestanze² (\varnothing 10 mm, Höhe 2 mm) entnommen. Den Kontrollgruppen M (120) bzw. (180) wurden die autologen Muskelstücke ohne weitere Modifikation in die Knorpeldefekte eingesetzt. Bei den Versuchsgruppen M Ad.BMP-2 (120) bzw. (180) wurden die Stücke in toto dem Gentransfer unterzogen. Es fand somit keine Isolierung von Stamm- oder Muskelzellen statt.

2. Methoden

2.1. Studiendesign

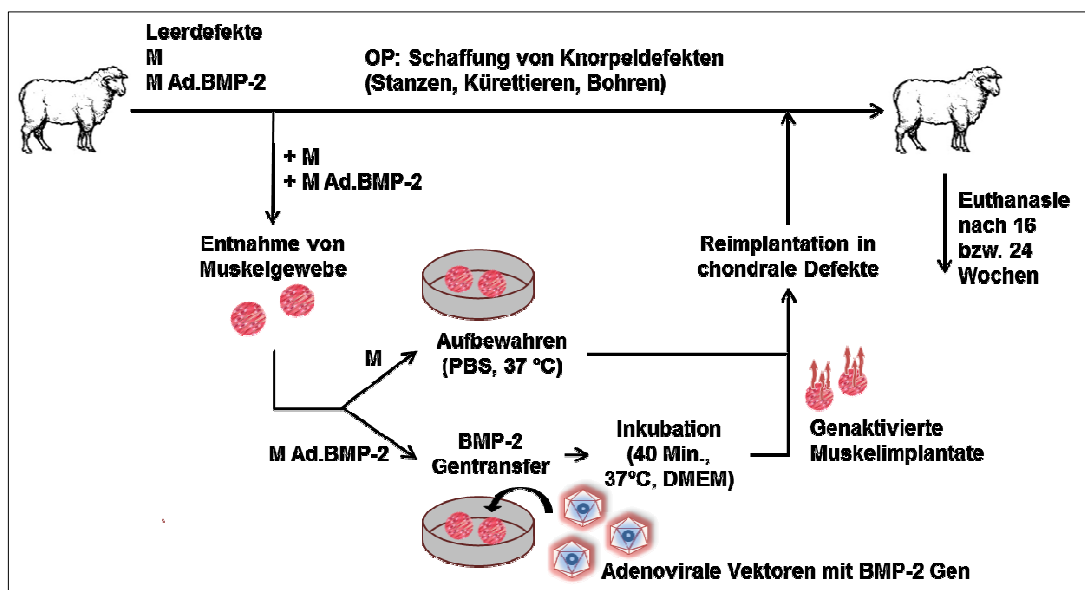


Abbildung 9: Studiendesign im Überblick

2.2. Präoperative Vorbereitung der Versuchstiere

Die Tiere wurden zwei bis drei Tage vor Versuchsbeginn in die Einrichtung verbracht, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. 24 Stunden vor OP-Beginn wurde den Schafen das Futter entzogen, Wasser stand bis kurz vor der Operation ad libitum zur Verfügung.

Nach Umsetzen und Fixation der Tiere, erfolgte das Legen eines 18G Venenverweilkatheters³ in die Vena cephalica antebrachii. Nach Abnahme von Blut in ein EDTA- und ein Serumröhrchen wurde das Tier mittels intravenöser Verabreichung von Diazepam⁴ (0,4 mg/kg i. v.) sediert.

² Acupunch® 10mm, Acuderm inc., Ft. Lauderdale, Florida, USA

³ Vasofix® Safety, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

⁴ Diazepam-ratiopharm® 10 mg/2 ml Injektionslösung, ratiopharm GmbH, Ulm,

Darauf erfolgte die Narkoseeinleitung mit Propofol 2 %⁵ (Dosierung nach Wirkung) bis zu einer ausreichenden Relaxation, um die Intubation unter Zuhilfenahme eines Laryngoskops mit einem Murphy-Tubus (Durchmesser 9,0-9,5 mm) durchzuführen. Das Schaf wurde schließlich auf dem OP-Tisch in Rückenlage positioniert. Nach weiterer Vertiefung der Narkose mit Propofol 2 % i. v. wurde das Tier an ein Beatmungsgerät⁶ angeschlossen und volumen- als auch frequenzgesteuert künstlich beatmet. Die Atemfrequenz wurde auf 12-15 Züge pro Minute, das Atemzugvolumen auf etwa 100 ml/10 kg KGW eingestellt. Über eine Kapnographie wurde der expiratorische CO₂-Gehalt (35-45 mmHG) gemessen. Die weitere Narkoseüberwachung gelang mit der pulsoxymetrischen Überprüfung der Herzfrequenz und der Sauerstoffsättigung im Blut. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte über Isoflurangasinhalation⁷ (1,5 %-2,0 %) und einem Ketamindauertropf⁸ (8 mg/kg/h). Die weitere Prämedikation umfasste die intravenöse Gabe eines Antibiotikums⁹ (Cefuroxim 15 mg/kg) und des nicht-steroidalen Antiphlogistikums Ketoprofen¹⁰ (3 mg/kg i. v.), und Metamizol¹¹ (25 mg/kg i. v.). Um eine übermäßige Aufgasung des Pansens zu verhindern, wurde eine Pansen-Schlund-Sonde gelegt. Die Hornhaut wurde mit Augensalbe¹² vor Austrocknung geschützt. Zur eindeutigen Identifizierung bekamen die Tiere eine zusätzliche projektbezogene Ohrmarke gestanzt. Während der gesamten OP-Dauer erhielten die Tiere per Dauertropfinfusion eine Vollelektrolytlösung¹³.

Deutschland

⁵ Propofol®-Lipuro 20 mg/ml (2%), B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

⁶ Dräger Julian, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland

⁷ Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland

⁸ Ursotamin® 100 mg/ml, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland

⁹ Cefuroxim® Fresenius 750mg, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

¹⁰ Romefen PR 10%®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland

¹¹ Vetalgin® 500mg/ml, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

¹² Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

¹³ Ringer-Infusionslösung B. Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland



Abbildung 10: Beatmungsgerät und Narkose-Monitoring

Die notwendige Narkosetiefe (Chirurgisches Toleranzstadium II nach Güdel) wurde durch das oben beschriebene maschinelle Monitoring und durch Prüfen von zentraler Bulbusstellung, nicht mehr vorhandenem Lid-, aber hervorrufbarem Cornealreflex kontrolliert.

Die zu operierende rechte Hintergliedmaße wurde im Bereich des Kniegelenks großzügig geschoren und rasiert. Mit einer Waschlotion und Wasser wurde das OP-Feld gereinigt, die beiden Klauen der Hintergliedmaßen mit Handschuhen versehen und mit Mullbinden umwickelt. Das OP-Gebiet wurde schließlich mit einem gefärbten, propanolhaltigen Hautantiseptikum¹⁴ behandelt.

Anschließend wurde das Tier komplett mit sterilen Abdecktüchern mit Ausnahme des Operationsfeldes abgedeckt.



Abbildungen 11 und 12: Vorbereiten des OP-Feldes

¹⁴ Cutasept®G, BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland

2.3. Operation

2.3.1. Freilegen des rechten medialen Femurkondylus

Es wurde ein medialer Zugang zum Kniegelenk gewählt. Der Hautschnitt erfolgte parallel zur Patellarsehne auf Höhe der Patella bis zur Tuberositas tibiae und betrug ca. 7 cm. Nach vorsichtiger Durchtrennung der äußersten Muskelschichten, wurde der darunterliegende Fettkörper mit einem elektrischen Messer soweit wegpräpariert, dass die Gelenkkapsel erreichbar war. Diese wurde mit einem Skalpell stichinzidiert und vorsichtig nach distal und proximal weiter eröffnet. Unter Flexion des Kniegelenks war nun der mediale Femurkondylus zugänglich. Durch diese Herangehensweise konnte auf eine Dislokation der Patella verzichtet werden.

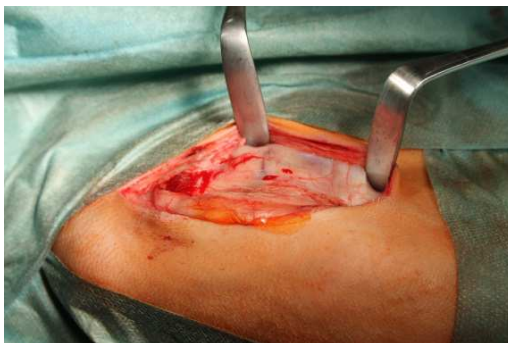


Abbildung 13: Hautschnitt medial des Kniegelenks

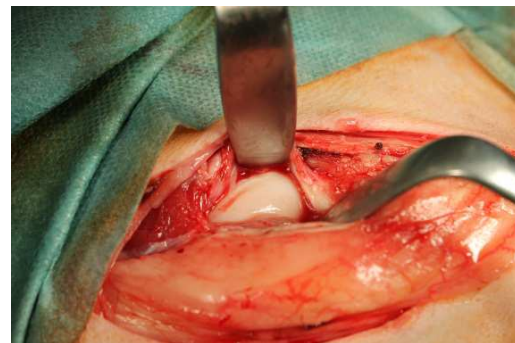


Abbildung 14: Freilegen des medialen Femurkondylus

2.3.2. Gewinnung der autologen Muskelfaszienstücke

Die zur Transduktion benötigten als auch die unbehandelten Muskelfaszienstücke wurden unter sterilen Bedingungen jeweils intra operationem aus der das Kniegelenk umgebenden Muskulatur gewonnen. Mithilfe einer sterilen Hautbiopsiestanze¹⁵ wurden pro Tier zwei Gewebezyylinder mit einem Durchmesser von 10mm und einer Höhe von ca. 2 mm ausgestanzt und in eine Petrischale verbracht, in der sich auf 37°C temperierte, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)¹⁶ befand.

¹⁵ Acupunch® 10mm, Acuderm inc., Ft. Lauderdale, Florida, USA

¹⁶ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

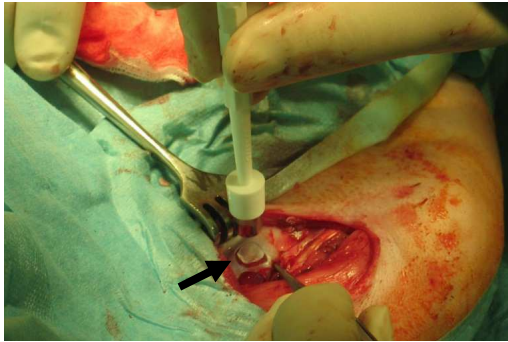


Abbildung 15: Ausstanzen eines Muskelzylinders (Pfeil)

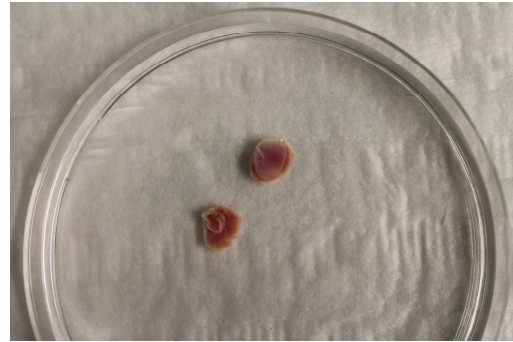


Abbildung 16: Ausgestanzte Muskelstücke in PBS

Bei der Entnahme der Muskelstücke wurde darauf geachtet, dass die proximale Oberfläche der Gewebezylinder von Faszie überzogen war. Dieses Vorgehen ermöglichte einen stabilen Zusammenhalt der Muskelfasern und damit das Annähen der Implantate an die Defektränder sowie die einfache und sichere Manipulation der Stücke. Die gewonnenen Muskelimplantate wurden in 50 ml Falcontubes, in denen sich ebenfalls 37°C warme, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)¹⁷ befand, in ein sich neben dem Operationssaal befindliches S2-Zelllabor zur Durchführung des Gentransfers transportiert. Die Gewebestücke, die ohne Genmodifikation wieder in den Defekt eingesetzt wurden, wurden ebenso in das Zelllabor verbracht, wo sie in einem Brutschrank bei 37°C bis zur Reimplantation aufbewahrt wurden.

2.3.3. Durchführung des Gentransfers

Das entnommene Muskelgewebe der Gruppe M Ad.BMP-2 wurde in einem S2-Labor sofort in eine 12-Well-Platte überführt und mit 37°C temperiertem DMEM¹⁸ unter Zusatz von Amphotericin¹⁹ (1 %) und Penicillin/Streptomycin²⁰ (1 %) versetzt. Während der Vorbereitung des Vektors wurden die Muskelstücke in einem 37°C warmen Brutschrank aufbewahrt.

Der adenovirale Vektor wurde zwischenzeitlich auf Zimmertemperatur gebracht und im Verhältnis 1:3 mit DMEM ohne weitere Zusätze verdünnt.

¹⁷ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

¹⁸ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

¹⁹ Amphotericin B Lösung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

²⁰ Penicillin/Streptomycin, Seromed (Biochrom GmbH), Berlin, Deutschland

Die 12-Well-Platten mit den Gewebestücken wurden nach Vorbereitung des Vektors aus dem Brutschrank entnommen und das Medium um die Stücke abpipettiert. Darauf erfolgte die Zugabe der Vektorsuspension (40 µl pro Stück). Die Inkubationszeit, in der die Gewebestücke im Brutschrank bei 37°C gelagert wurden, betrug 40 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Stückchen fünfmal mit je 50 ml körpertemperaturtem PBS gewaschen und darin wieder in den OP transportiert.

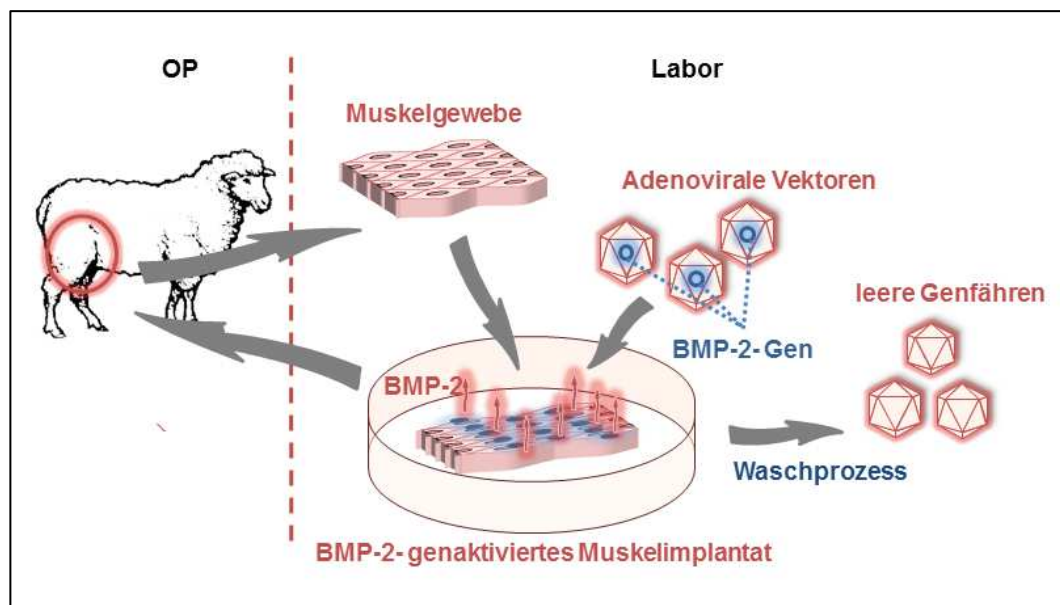


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Gentransfers

2.3.4. Setzen der chondralen Knorpeldefekte

Durch Flexion des Kniegelenks war der mediale Femurkondylus zugänglich, um mittels einer Hautbiopsiestanze²¹ (Durchmesser 8 mm) zwei übereinanderliegende, kreisrunde Einkerbungen im lasttragenden Bereich der medialen Femurkondyle zu schaffen. Der Abstand zwischen den Defekten betrug 4 mm.

²¹ Biopsiestanze 8 mm, pfm medical, Kai Europe GmbH, Solingen, Deutschland

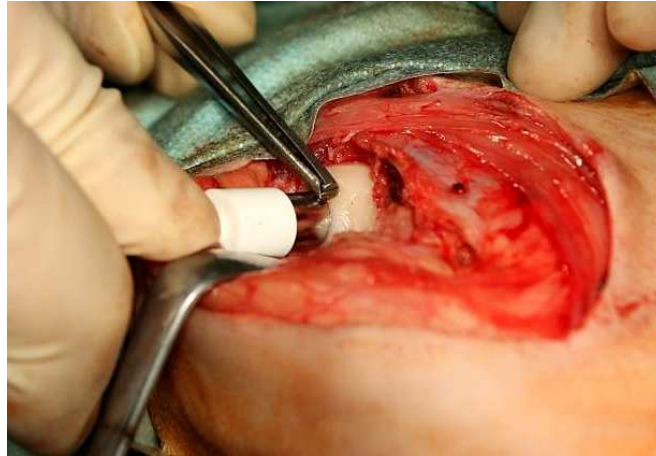


Abbildung 18: Setzen der Defekte mittels Hautbiopsiestanze (ø 8 mm)

Der Knorpel wurde anschließend mit einem Skalpell²² abgehoben. Um eine gleichmäßige Defektbodenfläche zu erhalten, wurde mit einer Ringkürette²³ (Durchmesser 5 mm) das verbliebene Knorpelgewebe abgeschabt und so gleichzeitig der Defektboden geglättet.

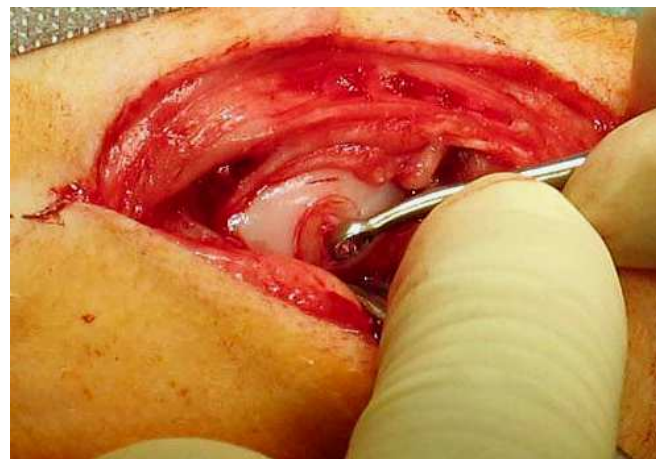


Abbildung 19: Kürettieren des Defektbereichs bis zur subchondralen Knochenplatte

2.3.5. Pridie-Bohrung

Nach Schaffen der zwei kreisrunden, chondralen Volldefekte kritischer Größe (8 mm²) im medialen Femurkondylus, wurde die Pridie-Bohrung durchgeführt. Dazu wurde die subchondrale Knochenschicht mithilfe eines hydraulischen Bohrers durchbrochen und Bohrlöcher mit einem Durchmesser von 1 mm und einer Tiefe von 1 cm geschaffen. Die

²² Feather disposable scalpel No. 15, Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan

²³ Kürette, ø 5 mm, beidseitig scharf, 15° abgewinkelt, Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Deutschland

Bohrung erfolgte nach folgendem Schema:

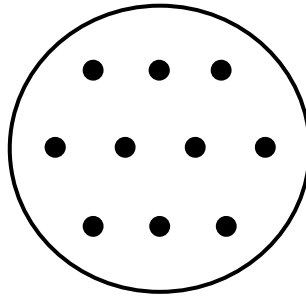


Abbildung 20: Anordnung der zehn Bohrlöcher

Ausschlaggebend für die ausreichende Tiefe der Bohrung war die auftretende Blutung aus den Bohrlöchern. Dies war nötig, um die gewünschte Stimulation des Knochenmarks zu erreichen und so eine Einwanderung von Stammzellen zu ermöglichen.



Abbildung 21: Chondrale Defekte nach Pridie-Bohrung

2.3.6. Reimplantation der autologen Muskelfaszienstücke

Bei Versuchsgruppen M und M Ad.BMP-2 wurden die zuvor entnommenen und zum Teil genmodifizierten Muskelfaszienstücke in die Defekte eingebracht. Fixiert wurden sie mittels Einzelheften unter Verwendung eines monofilen, resorbierbaren Fadens²⁴.

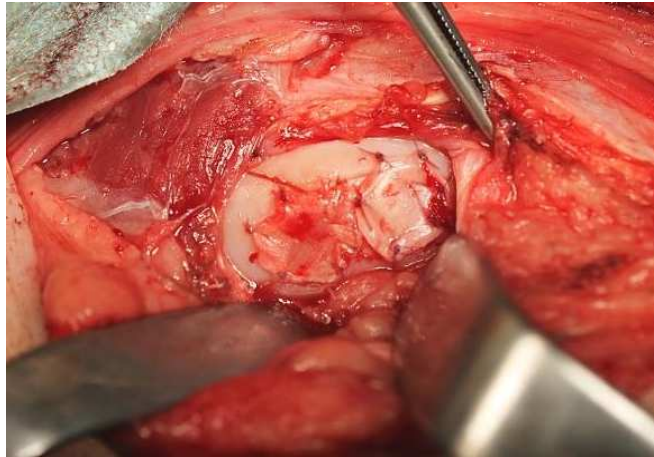


Abbildung 22: Eingenähte Muskelfaszienimplantate

2.3.7. Wundverschluss

Es folgte ein schichtweiser Wundverschluss mit resorbierbarem Nahtmaterial²⁵. Die äußere Haut wurde ebenfalls mit resorbierbarem Faden²⁶ fortlaufend intrakutan genäht und mit einem Sprühverband²⁷ versehen.

2.4. Postoperatives Management und Überwachung

Nach Abstellen der Inhalationsnarkose wurde die Pansensonde entfernt. Etwaige Ansammlungen von Speichel oder Pansensaft in der Maulhöhle wurden sorgfältig abgesaugt und das Tier in Brustlage gebracht. Die Extubation erfolgte erst nach vollständigem Wiedereinsetzen des Schluckreflexes. Bis zur sicheren Stehfähigkeit wurden die Tiere observiert.

²⁴ Monosyn 6-0, Glyconatmonofil, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

²⁵ Vicryl 2-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland

²⁶ Monocryl 4-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland

²⁷ OPSITE Spray Sprühverband, Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland

Die operierte Gliedmaße durfte sofort nach der OP vollständig belastet werden. Die Schafe verblieben für sieben Tage nach der Operation in den Ställen des Zentrums für Präklinische Forschung, um eine konsequente Überwachung inklusive Medikamentenapplikation zu gewährleisten sowie eine übermäßige Anstrengung zu vermeiden. Danach erfolgte der Transport zurück in den Herkunftsstall, wo die Schafe separat zur Restherde gehalten wurden.

Postoperative Analgesie

Über einen Zeitraum von 48 Stunden erhielten die Tiere Buprenorphin (0,01 mg/kg KGW i. m. zweimal täglich), wobei die erste Gabe bereits intra operationem erfolgte. Als weiteres Analgetikum wurde Ketoprofen (3 mg/kg KGW i. m.) einmal täglich über fünf Tage verabreicht.

2.5. Tötung und Sektion der Tiere

Nach einer Standzeit von 16 beziehungsweise 24 Wochen wurden die Tiere tierschutzkonform im Zentrum für Präklinische Forschung euthanasiert. Durch intravenöse Verabreichung von Pentobarbital (80 mg/kg KGW) und anschließender Gabe von 40 ml Kaliumchloridlösung wurde zunächst eine tiefe Hypnose erzeugt, gefolgt von Atem- und Herzstillstand. Letzterer wurde auskultatorisch mithilfe eines Stethoskops überprüft.

Beide Hintergliedmaßen wurden im distalen Bereich des Os femoris abgetrennt und die distale Gliedmaße ab der Mitte des Os tibiae entfernt. Die Kondylen beider Kniegelenke wurden vorsichtig freipräpariert, makroskopisch beurteilt und fotografiert. Um das Gewebe vor Austrocknung zu schützen, erfolgte eine stete Benetzung mit Ringerlösung. Zur weiteren biomechanischen und histologischen Untersuchung mussten die Defekte speziell aufgearbeitet werden.

2.6. Aufbereitung der Präparate zur weiteren Analyse

Nach Freilegen der Kondylen wurde das Präparat am Schaft des Os femoris eingespannt. Um Prüfkörper für den biomechanischen Test sowie der histologischen Analyse zu erhalten, wurden Probenzylinder mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Tiefe von ca. 7 mm mit einer Hohlstanze²⁸ ausgestanzt.



Abbildung 23 a und b: a) Die beiden Defektbereiche werden mit der Hohlstanze aus dem Kondylus ausgestanzt. b) Aus dem rechten Knie werden entsprechend dem linken Knie zwei native Zylinder ausgestanzt.

Am medialen Kondylus des linken gesunden Kniegelenkes wurde eine native Knorpelprobe entnommen, die als Kontrolle diente. Auch hier wurden die 8 mm Defekte auf die beschriebene Weise herausgelöst und fotografiert.

Die native Probe sowie der proximale Defekt wurden für die biomechanische Analyse in einen Metallzylinder (Innendurchmesser 1 cm) verbracht, in den sie pressgenau passten. Der distal ausgestanzte Defekt wurde sofort in Paraformaldehyd²⁹ überführt, da dieser für die histologische Auswertung verwendet wurde.

²⁸ Knorpel-Knochen-Stanze (10 mm), TETEC AG, Reutlingen, Deutschland

²⁹ Paraformaldehyd (Pulver), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland



Abbildung 24: Ausgestanzte Knorpelprobe im Metallzylinder

2.7. Auswertung

2.7.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Es wurden mehrere ELISA vor als auch während des Versuchs durchgeführt, um die Expression von BMP-2 *in vitro* zu messen. Zum einen wurde so vor dem Einsatz des adenoviralen Vektors im eigentlichen Versuch seine Funktionsfähigkeit sichergestellt. Zum anderen konnte die Höhe der Expression des Proteins BMP-2 *in vitro* quantitativ erfasst werden.

Gewinnung der Muskelproben für ELISA

Für den Vorversuch wurden im Rahmen der Euthanasie eines Schafes der Leerdefektgruppe zwei Muskelproben (jeweils ca. 4 cm x 2 cm) aus der Oberschenkelmuskulatur unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Proben wurden jeweils in ein 50 ml Falcon-Tube mit 37° C temperiertem DMEM unter Zusatz von Amphotericin (1%) und Penicillin/Streptomycin (1%) gegeben. Im S2-Zelllabor wurden aus jedem Muskelstück mit einer Hautbiopsiestanze³⁰ zwei Probenzylinder (ø 8 mm, Höhe 2 mm) ausgestanzt. Dabei wurde bei zwei Proben explizit darauf geachtet, dass ihre umgebende Faszie noch erhalten war. So gingen zwei Muskelbiopsien direkt aus dem Muskelinneren in die Kultivierung, zwei Proben aus dem äußeren Bereich der Muskulatur mit anliegender Faszie.

³⁰ Biopsiestanze 8 mm, pfm medical, Kai Europe GmbH, Solingen, Deutschland

So sollte untersucht werden, ob das zusätzliche Fasziengewebe einen Effekt auf die spätere Expression von BMP-2 hat. Die umgebende Faszie würde als natürliche „Hülle“ das Einnähen der Muskelstücke in den Defekt sicherer machen und die Muskelfasern am Ausreißen hindern. Gemessen wurde die BMP-2-Konzentration über einen Zeitraum von 30 Tagen.

Für einen zweiten ELISA wurden während den Operationen der Gruppe M Ad.BMP-2 (120) vier Tieren mithilfe der Hautstanze zusätzlich Muskelfasziengewebe entnommen und im Labor dem Gentransfer zugeführt. Diese Proben wurden über einen Zeitraum von 33 Tagen in DMEM mit 1 % Amphotericin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum³¹ (FCS) bei 37 °C kultiviert, um die Expressionsdauer von BMP-2 *in vitro* parallel zu den Operationen längerfristig zu messen.

Den Tieren der Gruppe M Ad.BMP-2 (180) wurden für einen dritten ELISA jeweils zwei zusätzliche Muskelproben (ø 1 cm) per Stanzverfahren entnommen und ebenfalls im S2-Labor der Transduktion unterzogen. Der Überstand wurde über einen Zeitraum von zwölf Tagen gesammelt.

Transduktion und Kultivierung

Unter der sterilen Werkbank erfolgte nun die Transduktion mit dem adenoviralen Vektor. Nach einer 1:3 Verdünnung mit DMEM wurden 40 µl der Vektorsuspension zu jedem Muskelstückchen gegeben und für 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde danach weitestgehend abpipettiert. Es erfolgte danach ein fünffacher Waschschrift mit PBS, um überschüssige Vektorsuspension von den Muskelproben abzuwaschen. Auf die gereinigten Muskelstückchen wurden jeweils 800 µl Vollmedium (DMEM unter Zusatz von Amphotericin (1 %), Penicillin/Streptomycin (1 %) und fetalem Kälberserum (10 %)) hinzupipettiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage, wobei der Flüssigkeitsüberstand pro Well jeweils in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß³² überführt und für die spätere Analyse mittels ELISA bei -80 °C tiefgefroren wurde.

³¹ Fetal Calf Serum (FCS), Seromed (Biochrom GmbH), Berlin, Deutschland

³² Eppendorf Safe-Lock Tubes (2 ml), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Prinzip und Durchführung der „Sandwich“-ELISA

Zur Durchführung der drei Assays wurden BMP-2 ELISA-Kits³³ verwendet. Das Testverfahren war ein quantitativer „Sandwich“-ELISA. Nach dieser Methode wird ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch BMP-2 fängt, in eine 96-Well-Platte vorgelegt. In den Medienüberständen vorhandenes BMP-2 bindet so an die immobilisierten Antikörper in den Kavitäten. Durch vier folgende Waschschriffe mit einer speziellen Pufferlösung werden überschüssige, ungebundene Substanzen entfernt. Danach wird ein zweiter, BMP-2 spezifischer Antikörper zugegeben, der wiederum mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase (HRP)) konjugiert ist.

Nach einem weiteren vierfachen Waschschriffe, der ungebundene Antikörper-Enzym-Komplexe entfernt, wird das Farbsubstrat (Tetramethylbenzidin (TMB)) hinzupipettiert. Dieses Substrat wird je nach Vorhandensein des gebundenen Antikörper-Enzym-Komplexes von dem Enzym in ein Reaktionsprodukt umgesetzt, was sich in Form eines Farbumschlags zeigt. Die Intensität dieses Farbwechsels richtet sich dabei nach dem initial gebundenen Antigen (BMP-2). Nach dreißig Minuten wird die Reaktion gestoppt und die Intensität der Farbe mithilfe eines Lesegerätes³⁴ bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

³³ Quantikine BMP-2 Immunoassay, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

³⁴ Synergy HTX Multi-Detektions-Reader, BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland

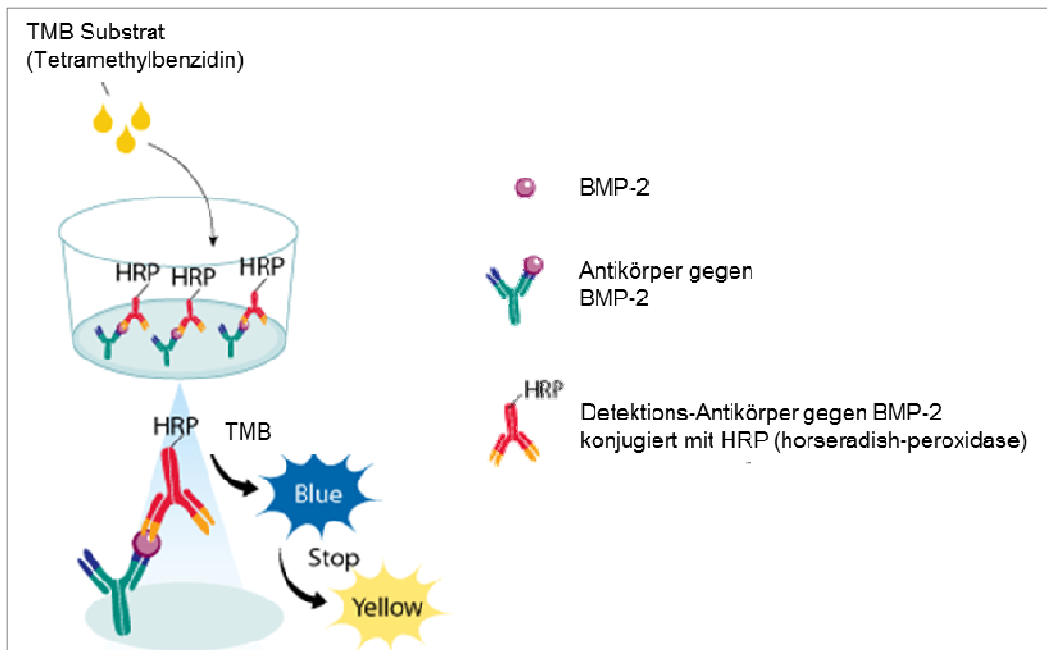


Abbildung 25: Methode des „Sandwich“-ELISA (modifiziert nach R&D Systems GmbH, http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_quantikineelisaassayprinciple.aspx)

Aus der mitgelieferten BMP-2-Standardlösung wird per Verdünnungsreihe die Standard-Testsuspension angesetzt und zusammen mit den Zellkulturüberständen gemessen. Über diese Standardreihe mit definierten BMP-2-Konzentrationen (0-4000 pg/ml) kann danach auf die in den Proben vorhandenen BMP-2-Mengen geschlossen werden.

2.7.2. Biomechanische Auswertung

2.7.2.1. Prinzip des Indentationstests

Nach der Präparation der Knorpel-Knochen-Zylinder wurden für jede Versuchsgruppe der proximale Defekt am medialen Kondylus des rechten Knies und jeweils eine gesunde Knorpelprobe am kontralateralen medialen Femurkondylus des rechten Kniegelenks einer biomechanischen Analyse unterzogen. Basierend auf der bereits beschriebenen Annahme, dass Knorpelgewebe als biphasisches Gewebe (flüssig und fest) anzusehen ist (MOW et al., 1980), wurde zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften des neu gebildeten Gewebes ein Indentationstest durchgeführt. Dieser Eindruckversuch ist die bislang am häufigsten angewandte Methode, um biomechanische Parameter von Knorpelgewebe zu bestimmen (LINN & SOKOLOFF, 1965; MOW et al.,

1984; APPLEYARD et al., 2001).

Das Prinzip dieses Tests basiert auf der Fragestellung, wie sich das Gewebe unter Belastung und Entlastung verhält. Dazu wird mittels eines Stempels (Indenter) bis zu einer vorher festgelegten maximalen Kraft die Probe komprimiert und nach einer 60 Sekunden dauernden Halteposition wieder entlastet.

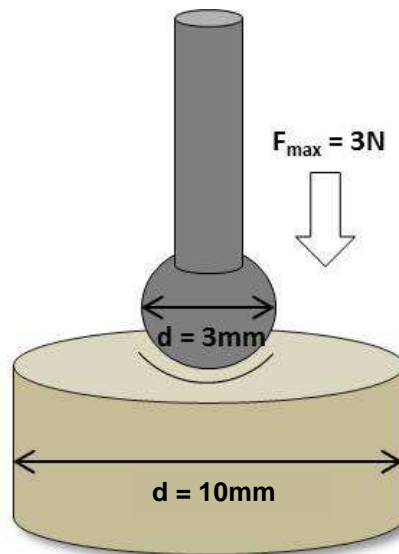


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Indentationsversuchs. Der Kugelstempel drückt mit konstanter Geschwindigkeit bis zu einer Maximalkraft von drei Newton auf die Probe.

Der dabei zurückgelegte Weg des Stempels wird von einer speziellen Software³⁵ erfasst. Aus den gemessenen Größen Zeit, Weg und Kraft, ergibt sich für jede Probe ein bestimmtes Kraft-Zeit-Diagramm.

³⁵ TestXpert 8.1, Zwick, Ulm, Deutschland

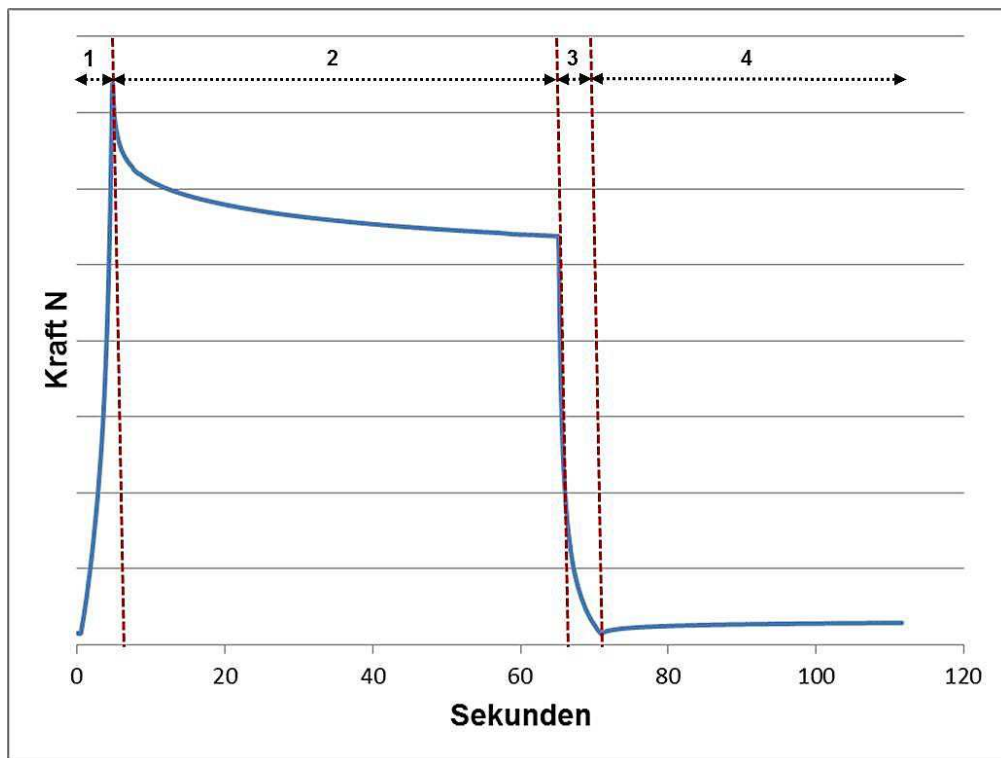


Abbildung 27: Belastungskurve im Kraft-Zeit-Diagramm über einen Zyklus

Phasen im Kraft-Zeit-Diagramm:

1: Dynamische Kompressionsphase

Der Indentor drückt bis zum Erreichen der Maximalkraft von 3 N mit konstanter Geschwindigkeit von 5 mm/min auf die Probe.

2: Statische Kompressionsphase

Der Stempel hält seine Position für 60 Sekunden.

3: Entlastungsphase

Der Indentor wird wieder in die Ausgangsposition gebracht.

4: Pause für 60 Sekunden bis ein neuer Zyklus beginnt

Jede Probe wurde einer biomechanischen Testung von fünf Zyklen unterzogen, um eine möglichst physiologische, dynamische Belastung des Knorpels zu simulieren.

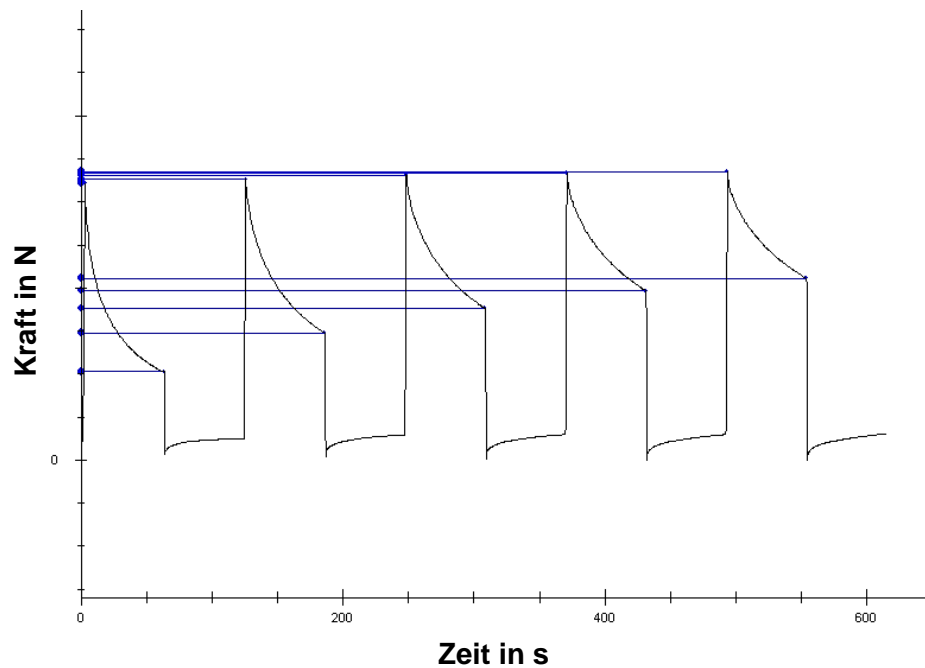


Abbildung 28: Exemplarische Belastungskurve über fünf Zyklen

2.7.2.2. Steifigkeit als biomechanische Messgröße

Aus den Größen Kraft und Weg kann der biomechanische Parameter „Steifigkeit (N/mm)“ errechnet werden. Dieser Wert gibt Auskunft über die Fähigkeit eines Materials, sich seiner eigenen Verformung zu widersetzen. Mathematisch betrachtet, lässt sie sich aus der Steigung einer Geraden auf der Belastungskurve ableiten.

Je höher dieser Wert für eine Probe ausfällt, desto widerstandsfähiger, also härter, ist dieses Gewebe. Es ist zu beachten, dass die hier erhobenen Steifigkeitswerte nur innerhalb dieses Testprotokolls Aussagekraft besitzen und nicht als absolute Größen auf andere Studiendesigns übertragbar sind. Je nach Einstellung der Maximalkraft und der Größe des Indentors würden sich für ein und dieselbe Probe andere Steifigkeitswerte ergeben.

2.7.2.3. Versuchsdurchführung

Die ausgestanzten Gewebezylinder wurden in einen Metallzylinder (Innendurchmesser 1 cm) pressgenau eingepasst, um sie in einer

Materialprüfmaschine³⁶ zu fixieren.



Abbildung 29: Knorpel-Knochen-Zylinder im Metallträger

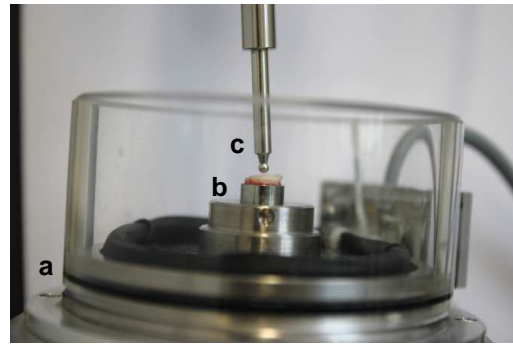


Abbildung 30: (a) Schwenkbare Messkammer; (b) Metallträger mit Probe; (c) Kugelindenter

Mithilfe einer schwenkbaren Platte, auf der die Messkammer angebracht war, konnte die Oberfläche der Knorpel-Knochen-Zylinder stets lotrecht zum Kugelindenter ausgerichtet werden. Die Kugel war aus Stahl und maß 3 mm im Durchmesser. Der Indenter war an einer 20 Newton Kraftmessdose³⁷ angebracht. Nach Vorfahren des Indentors bis zum Erreichen einer Vorlast von 0,1 Newton wurde die Probe über fünf Zyklen belastet. Während den Messungen wurden die Proben mit 0,9 % Ringer-Infusionslösung stets feucht gehalten.

³⁶ Zwicki 1120, Zwick Roell GmbH, Ulm, Deutschland

³⁷ Kraftmessdose 20 N, KAP-S Kl. 0,1., A.S.T GmbH, Dresden, Deutschland

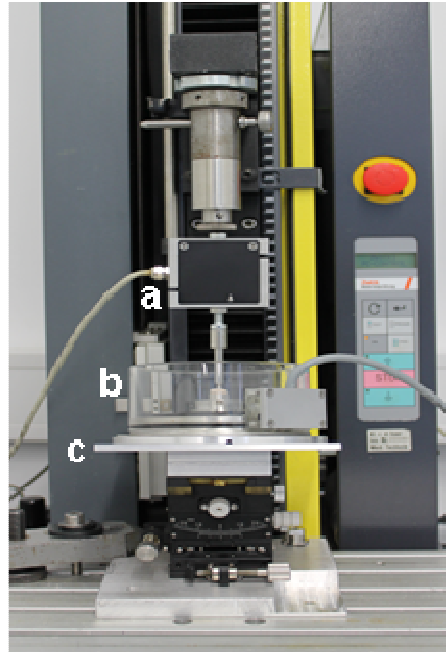


Abbildung 31: Aufbau des Indentationstests in der Zwick-Materialprüfmaschine (a) 20 Newton Kraftmessdose mit Kugelindentor an der Spitze (b) Messkammer mit der Probe (c) schwenkbarer Tisch

2.7.2.4. Lokalisierung des Messortes

Native Knorpelproben, Kontrollgruppe L und Versuchsgruppen M (120), M Ad.BMP-2 (120) und M Ad.BMP-2 (180)

Aufgrund der teilweise massiven Inselbildung von Reparaturgewebe wurde zur Bestimmung des Messortes folgende Methodik (siehe Abb. 32) angewandt:

1. Es wurde eine Messung auf einer makroskopisch deutlich erkennbaren Stelle mit Gewebeneubildung durchgeführt, als auch eine Messung an einem Ort mit fehlender Gewebeneubildung
2. Bei Defekten, die rein makroskopisch gar nicht gefüllt waren, wurde einmal im Zentrum des Defektes gemessen und diese Messung als signifikant für diesen Defekt betrachtet.
3. Bei Defekten die vollständig gefüllt waren, wurde ebenfalls einmal im Zentrum gemessen.

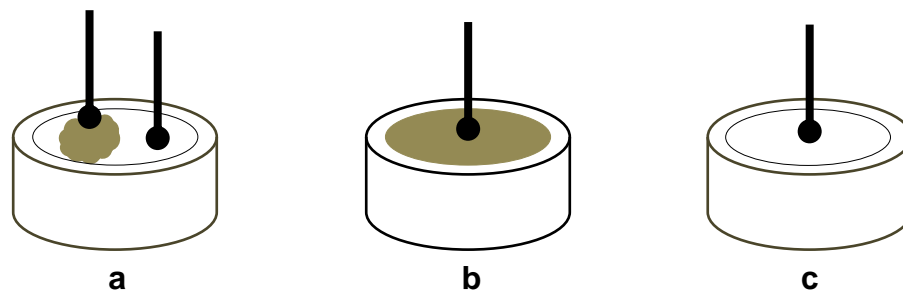


Abbildung 32: Lokalisation des Indentors im ehemaligen Defektbereich (a) Messung auf Gewebeinsel und im nicht gefüllten Bereich (b) Messung zentral im gefüllten Defektbereich (c) Messpunkt zentral im nicht gefüllten Defektbereich



Abbildung 33: Messpunkte bei Defekten mit starker Inselbildung. Erster Messpunkt: Gewebeinsel innerhalb des Defektes (dicker schwarzer Pfeil); Zweiter Messpunkt: nicht gefüllte Stelle des Defektes (dünner Pfeil). Die schwarze Filzstift-Markierung oben diente zur Kennzeichnung der ursprünglichen Lage des Defektes im Gelenk (hier Norden)

Versuchsgruppen M (180) und M Ad.BMP-2 (180)

Um eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der biomechanischen Testung zu gewinnen, wurde bei den beiden Versuchsgruppen M (180) und M Ad.BMP-2 (180) eine Fünf-Punkt-Messung durchgeführt. Bei jedem Tier wurden die kontralaterale gesunde Probe und der Defekt fünfmal in jeder Himmelsrichtung gemessen. Zur korrekten Ausrichtung diente die schwarze Markierung. Aus den fünf gemessenen Werten wurde für jeden Zyklus ein Mittelwert gebildet.

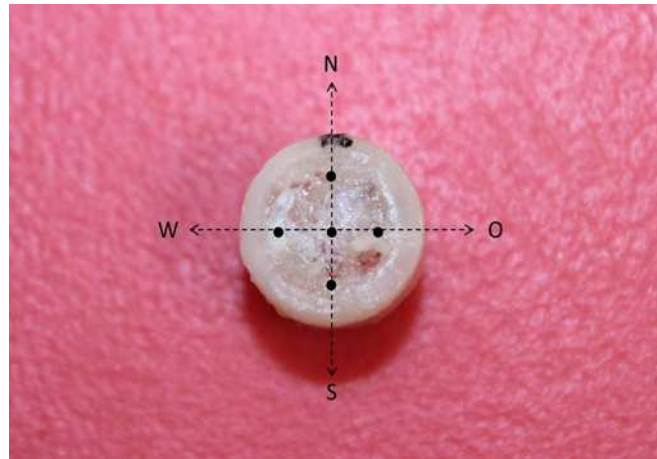


Abbildung 34: Fünf-Punkt-Messung. Die Orientierung erfolgte gemäß eines imaginären Fadenkreuzes zur Bestimmung der fünf Messpositionen (schwarze Punkte).

2.7.3. Immunhistochemie und Histologie

2.7.3.1. Vorbereitung der Proben

Die ausgestanzten distalen Knorpelzylinder wurden sofort, die proximalen Knorpelproben unmittelbar nach ihrer biomechanischen Testung in neutral gepufferter Formaldehydlösung³⁸ (4 %) fixiert. Dies diente dazu, eine fortschreitende enzymatische Autolyse des Gewebes zu verhindern. Geachtet wurde hierbei auf ein ausreichendes Mengenverhältnis zwischen Probe und Fixativ von 1:20.

Die Fixationsdauer betrug 48 Stunden unter Raumtemperatur auf einem Schüttler³⁹.

Nach der vollständigen Fixierung wurden die Präparate in große Paraffinkassetten verbracht und für eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gespült, um die Fixierlösung aus dem Gewebe zu entfernen und so eine Wechselwirkung mit der nachfolgenden Entkalkungsflüssigkeit zu vermeiden.

Für die spätere Herstellung von Paraffinschnitten war es notwendig, die Knorpel-Knochen-Zylinder in ein Entkalkungsmedium zu geben. Die

³⁸ Hergestellt aus Paraformaldehyd, Pulver, Merck, Darmstadt, Deutschland

³⁹ CERTOMAT MO II, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Kassetten mit den Proben wurden in eine 20 % EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Lösung⁴⁰ gegeben und bei Raumtemperatur auf dem Schüttler über zwei Monate entkalkt. Der Wechsel des Entkalkungsmediums erfolgte wöchentlich. Nach vollständiger Entkalkung wurden die Probenkassetten mit den Knorpel-Knochen-Zylindern unter fließendem Leitungswasser für einen Tag gewässert, um die EDTA-Lösung restlos zu entfernen und die Stücke für die Einbettung in Paraffin im Automaten vorzubereiten.

Die runden Probenstücke wurden zunächst exakt in der Mitte des Defekts mit einem Skalpell in zwei Hälften geteilt. Die Probenhälften wurden wiederum in Paraffinkassetten verbracht und in einem Gewebeeinbettautomaten⁴¹ über Nacht behandelt. Darin liefen folgende vier Bearbeitungsprozesse: Fixation, Dehydratation („aufsteigende Alkoholreihe“: 70 %-96 %-100 %-Ethanol), „Clearing“ (mit Roti-Histol⁴²) und schließlich die Paraffininfiltration.

Die Knorpelzylinderhälften wurden nun jeweils mit der Schnittfläche nach unten in einem Ausgießschälchen mit Paraffin umschlossen. Dies wurde mithilfe eines Paraffineinbettungsgerätes vorgenommen, das das feste Paraplast⁴³ auf 60 °C erhitzte und verflüssigte. In den metallenen Ausgießschälchen mit oben aufgesetztem Kassettenboden erkalteten die Gewebestücke auf einer -10 °C temperierten Platte und härteten so zur erforderlichen Schnittfestigkeit aus. Bis zum Schneiden am Paraffinmikrotom wurden die Blöcke bei Raumtemperatur (+20 °C) gelagert.

⁴⁰ EDTA-4 Na 20 %- Citronensäure pH 7,1, Hausapotheke des Klinikums Großhadern, München, Deutschland

⁴¹ Shandon Hypercenter XP, GMI Inc., Minnesota, USA

⁴² Roti-Histol, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

⁴³ Paraplast Paraffin, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

2.7.3.2. Anfertigen von Schnitten am Mikrotom

An einem Rotations-Mikrotom⁴⁴ wurden die zuvor über Nacht bei +4 °C gekühlten Paraffinblöcke mit einer Dicke von 8 µm geschnitten. Für die spätere Auswertung im Score wurden pro Defekt drei Schnittebenen betrachtet, einmal die Mitte des ehemaligen Defektes und nochmal im Abstand von 1500 µm. Da zur besseren Handhabung die Knorpelzylinder zuvor halbiert wurden, ging für eine Hälfte nur die Schnittebene 1500 µm in die Wertung ein, um eine Doppelbeurteilung der Mitte (0 µm) zu vermeiden.

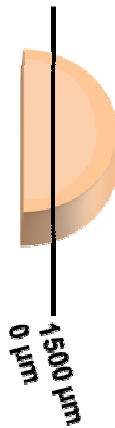


Abbildung 35: In die histologische Auswertung gingen die Bereiche der Schnittebenen 0 µm und 1500 µm ein.

Die Gewebeschnitte wurden in einem am Mikrotom angefügten erwärmten Wasserbad aufgefangen. Durch die Oberflächenspannung des Wassers entfalteten sich die Schnitte und konnten glatt auf Adhäsions-Objektträger⁴⁵ aufgezogen werden. Die Trocknung erfolgte im Trockenschrank bei +50 °C für 24 Stunden.

2.7.3.3. Färbungen

Vor allen Färbungen wurden die Schnitte entparaffiniert („absteigende Alkoholreihe“), um die Präparate zu rehydrieren und damit färbbar zu machen (s. Anhang).

⁴⁴ Leica RM 2255, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland

⁴⁵ Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Histologische Färbung: Safranin-Orange/Lichtgrün

Diese Färbemethode wird standardmäßig zur Knorpeldarstellung verwendet. Mittels des Farbstoffes Safranin-Orange lässt sich der Anteil an Proteoglykanen im Knorpel anfärben. Je intensiver die rot-orange Färbung im Präparat ist, desto höher der Gehalt an Proteoglykanen. Knochen- und Bindegewebe werden durch den Farbstoff Lichtgrün dargestellt. Zellkerne erscheinen dunkelrot. Die so gefärbten Schnitte dienen als Grundlage für die Auswertung im Knorpelregenerations-Score. Färbereihe Safranin-Orange / Lichtgrün (s. Anhang).

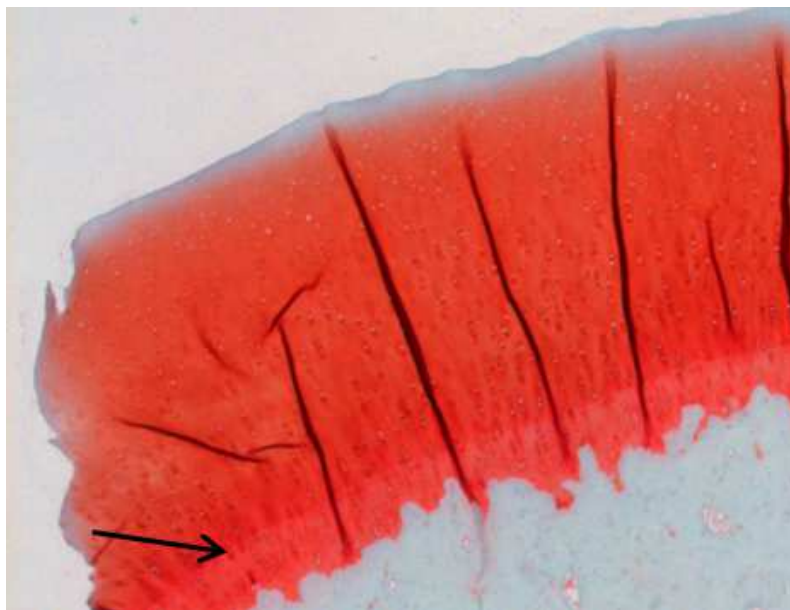


Abbildung 36: Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung. Bindegewebe und Knochen sind grün, hyaliner Knorpel und Zellkerne rot dargestellt. Der schwarze Pfeil markiert die gut zu erkennende Tidemark.

Immunhistochemische Färbungen

Das Prinzip immunhistochemischer Nachweisverfahren beruht auf dem Sichtbarmachen einer Antigen-Antikörper-Verbindung. Mittels verschiedener kommerziell erhältlicher Antikörper, an denen ein spezielles Farbreaktionssystem gekoppelt ist, können bestimmte Antigene (hier: knorpelspezifische Proteoglykane wie Kollagen Typ I und Kollagen Typ II) nachgewiesen werden.

Bei den Kollagen I und Kollagen II Färbungen wurde die sogenannte indirekte Methode angewendet:

An das gesuchte Antigen bindet ein spezifischer primärer Antikörper. Um diese Reaktion sichtbar zu machen, fügt man einen sekundären Antikörper, der mit Biotin markiert ist, hinzu. Biotin hat wiederum eine starke Affinität zu Avidin und Streptavidin. Daher gibt man den sog. ABC-Komplex hinzu, eine Verbindung aus Avidin, Biotin und Enzymmolekülen, der an den sekundären Antikörper bindet und danach ein zugegebenes Chromogen (DAB) zu einem stabilen Farbstoff umsetzt. Zur besseren Darstellung der Morphologie wurden die Zellkerne mit Hämalaun noch gegengefärbt.

a.) Kollagen Typ I-Färbung

Kollagen Typ I kommt hauptsächlich in Bindegewebe, Knochen und auch in Faserknorpel vor. Im histologischen Schnitt erkennt man dies anhand der Braunfärbung von Gewebe mit einem hohen Kollagen Typ I-Anteil.

Kollagen Typ I-Färbereihe (s. Anhang).

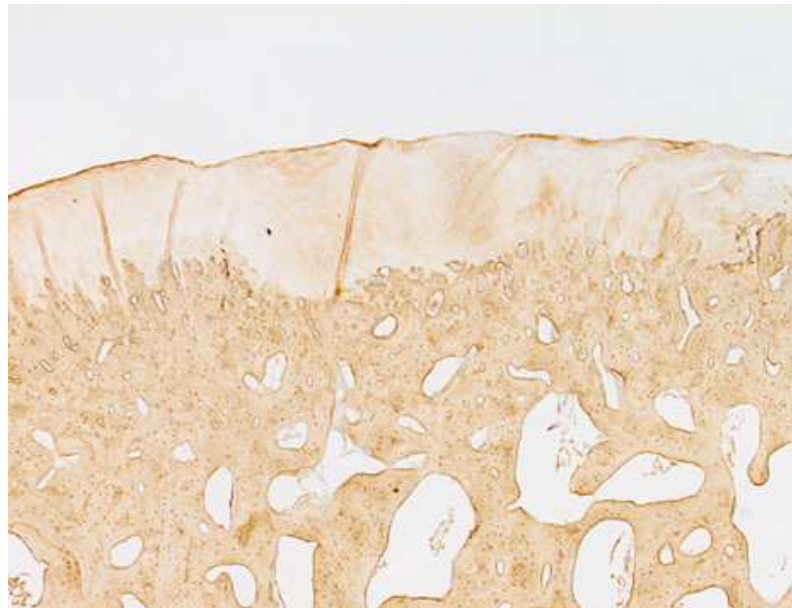


Abbildung 37: Kollagen Typ I-Färbung. Der subchondrale Knochen färbt sich aufgrund des hohen Kollagen Typ I-Anteils braun an.

b.) Kollagen Typ II-Färbung

Kollagen Typ II ist charakteristisch für hyalinen Gelenkknorpel. Daher färbt sich der hyaline Knorpel bei dieser Färbung braun an.

Färbereihe Kollagen Typ II (s. Anhang).

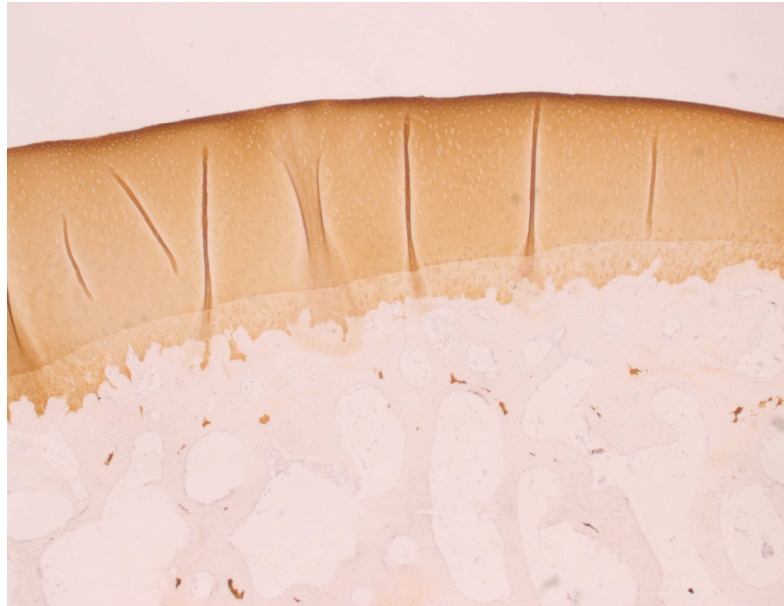


Abbildung 38: Kollagen Typ II-Färbung. Der hyaline Knorpel verfärbt sich aufgrund seines hohen Kollagen Typ II-Gehalts braun.

Die mit Kollagen Typ I und II gefärbten Präparate gingen in die Bewertung im Score zur Knorpelregeneration zusätzlich mit ein.

2.7.3.4. Erweiterter O'Driscoll-Score

Die gefärbten Präparate wurden von drei unabhängigen Betrachtern mithilfe eines um Kollagen Typ I und Kollagen Typ II erweiterten O'Driscoll-Scores ausgewertet.

Der O'Driscoll-Score war der erste Score für eine qualitative und semiquantitative Beurteilung der Knorpelheilung von osteochondralen Defekten im Kaninchenmodell (O'DRISCOLL et al., 1986). Er wird nach wie vor sehr oft für die Beurteilung der Knorpeldefektheilung in Tiermodellen herangezogen (SARIS et al., 2003; CHEVRIER et al., 2007; VIZESI et al., 2007). Dieser Score adressiert im Gegensatz zu anderen Knorpelheilungsscores die Integration des neu gebildeten Gewebes in das umliegende Gewebe.

Der Score legt vier Hauptkriterien zur Defektheilung fest: „Natur des vorherrschenden Gewebes im Defekt“, „Strukturelle Eigenschaften“, „Keine zellulären Anzeichen von Degeneration“ und „Keine degenerativen

Veränderungen im umliegenden, intakten Knorpel“. Diese Kategorien werden weiter unterteilt und über ein Punktesystem bewertet (s. Tabelle 1)

In der ersten Kategorie werden Zellmorphologie und Anfärbbarkeit der Matrix mit Safranin-Orange bewertet. Hyaliner Knorpel erhält 4 Punkte, Bindegewebe und Knochen dagegen nur 0 Punkte. Safranin-Orange deutet auf das Vorhandensein von Glykosaminoglykanen hin, die in hohem Maße in hyalinem Knorpel vorhanden sind, so dass eine „normale“ Anfärbung mit Safranin-Orange wie bei gesundem Knorpelgewebe mit 3 Punkten bewertet wird.

Die zweite Kategorie erfasst die Struktur des neuen Gewebes, insbesondere die Oberflächenbeschaffenheit (glatt/intakt bis schwer gestört mit Fibrillation (3 bis 0 Punkte)), die strukturelle Integrität (normal bis schwere Zerstörung (2 bis 0 Punkte)), die Dicke des Regenerats (100 % bis 0 % des normalen angrenzenden Knorpelgewebes (2 bis 0 Punkte)) sowie die Anbindung an den umliegenden gesunden Knorpel (an beiden Enden des Regenerats bis gar nicht an den angrenzenden Knorpel angebunden (2 bis 0 Punkte)).

In der nächsten Kategorie werden Anzeichen für eine Degeneration von Knorpelgewebe thematisiert, in diesem Fall Hypozellularität und Chondrozytencluster. Hypozellularität, d.h. eine geringe Menge an Chondrozyten im Regenerat, ist ein Merkmal für mangelhafte Knorpelneubildung im Defekt. Für den physiologischen Zustand werden hier 3 Punkte vergeben, für eine stark ausgeprägte Hypozellularität 0 Punkte. Das Vorhandensein von Chondrozytenanhäufungen („Clusterbildung“) spricht für eine Schädigung des Knorpelgewebes. Es kommt immer dann zur Entstehung von Chondrozytenclustern, wenn verbliebene Knorpelzellen infolge des Degenerationsprozesses mit erhöhter bis hin zu unkontrollierter Proliferation und Steigerung ihrer metabolischen Aktivität reagieren (MARTIN & BUCKWALTER, 2001). Keine Cluster im Präparat werden daher mit 2 Punkten, mehr als 25% der Zellen in Gestalt von Clustern mit 0 Punkten beurteilt.

Letztes Kriterium im originären O'Driscoll-Score ist die Betrachtung des angrenzenden Knorpelgewebes um den Defekt. Sind hier Anzeichen einer

Degeneration vorhanden, wird dies über eine Abstufung der Punktzahl bewertet (normale Zellzahl, keine Cluster und normale Safranin-Orange-Färbung erhält 3 Punkte).

Je höher nun die erreichte Gesamtpunktzahl ist, desto besser die Regeneration im Defektbereich.

O'Driscoll-Score		
I. Vorherrschendes Gewebe		
a.) Zellmorphologie	Hyaliner Gelenkknorpel	4
	Unvollständig differenziertes Mesenchym	2
	Bindegewebe oder Knochen	0
b.) Anfärbarkeit der Matrix mit Saf-O	Normal oder fast normal	3
	Mittel	2
	Schwach	1
	Keine	0
II. Strukturelle Eigenschaften		
a.) Gleichmäßigkeit der Oberfläche	Glatt und intakt	3
	Oberflächlich horizontale Schichtung	2
	Risse 25 – 100% der Dicke	1
	Schwere Zerstörung, einschließlich Fibrillation	0
b.) Strukturelle Integrität	Normal	2
	Leichte Störung einschließlich Zysten	1
	Schwere Zerstörung	0
c.) Dicke	100% des angrenzenden normalen Knorpels	2
	50 – 100% des normalen Knorpels	1
	0 – 50% des normalen Knorpels	0
d.) Anbindung an angrenzenden Knorpel	An beiden Enden des Implantats angebunden	2
	An einem oder an beiden Enden teilw. verbunden	1
	Keine Anbindung	0
III. Zeichen von Zellveränderungen oder Degeneration		
a.) Hypozellularität	Normale Zelldichte	3
	Leichte Hypozellularität	2
	Mittelschwere Hypozellularität	1
	Schwere Hypozellularität	0
b.) Chondrozytencluster	Keine Cluster	2
	<25% der Zellen	1
	25-100% der Zellen	0
IV. Degenerationszeichen im angrenzenden Knorpel		
	Normale Zelldichte, keine Cluster, normale Färbung	3
	Normale Zelldichte, leichte Clusterbildung, mittlere Anfärbarkeit	2
	Leichte bis mittlere Hypozellularität, leichte Clusterbildung, mittlere Anfärbarkeit	1
	Schwere Hypozellularität, schlechte oder keine Anfärbarkeit	0
GESAMTPUNKTZAHL		24

Tabelle 1: Score zur Beurteilung der Knorpelheilung nach O'Driscoll (O'DRISCOLL et al., 1986)

Eine Erweiterung des ursprünglichen O'Driscoll-Scores um die immunhistologischen Färbungen war aus Sicht der Arbeitsgruppe sinnvoll, um die Qualität des neu gebildeten Gewebes noch genauer bewerten zu

können. Daher wurden weitere Punkte für die „Anwesenheit von Kollagen Typ I“ und die Anwesenheit von Kollagen Typ II“ vergeben (s. Tabelle 2).

Erweiterungen		
V. Anwesenheit von Kollagen I	Kein Nachweis von Kollagen I (vgl. nativ)	3
	Geringgradig Kollagen I in Teilen des Regenerats	2
	ausgeprägt Kollagen I in Teilen des Regenerats	1
	Kollagen I im ganzen Regenerat oder knöcherne Obfl.	0
VI. Anwesenheit von Kollagen II	Kollagen II im ganzen Regenerat (vgl. nativ)	3
	Ausgeprägtes Kollagen II in Teilen des Regenerats	2
	Geringgradig Kollagen II in Teilen des Regenerats	1
	Kein Nachweis von Kollagen II	0
GESAMTPUNKTZAHL		6

Tabelle 2: Erweiterungen des O'Driscoll-Scores um die Kriterien „Anwesenheit von Kollagen Typ I“ und „Anwesenheit von Kollagen Typ II“

Die maximal zu erreichbare Punktzahl im erweiterten Score erhöhte sich somit auf 30 Punkte.

In den Score gingen die Schnitte durch die Mitte des ehemaligen Defektes sowie im Abstand von 1,5 mm zur Mitte ein. Damit ergaben sich pro Defekt drei Schnitte, aus denen der Mittelwert gebildet wurde.

2.7.4. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus Biomechanik und Histologie erfolgte mit dem Softwarepaket G*Power 3 (FAUL et al., 2007)

In die biomechanische Auswertung gingen jeweils die Steifigkeitswerte aus Zyklus 5 ein.

Für die histologische Auswertung wurde ein Durchschnittswert aus den erreichten Punktzahlen der drei Schnittebenen pro Defekt errechnet und statistisch ausgewertet.

Da nicht von einer Normalverteilung der Ergebnisse ausgegangen werden kann und jeweils die distalen und proximalen Defekte verschiedener Schafsknie miteinander verglichen wurden und so als unabhängig anzusehen sind, wurde der nicht-parametrische *Mann-Whitney-U-Test* für Vergleiche von zwei Versuchsgruppen bzw. ein *Kruskal-Wallis-Test* für Vergleiche von mehr als zwei Gruppen ausgewählt.

IV. ERGEBNISSE

1. ELISA Auswertung

ELISA 1

Im ersten ELISA wurde die Funktionsfähigkeit des Vektors und gleichzeitig der Unterschied in der BMP-2-Expression zwischen der Transduktion von reinem Muskelgewebe (M1, M2) sowie von Muskelgewebe mit anliegender Faszie (MF 1, MF 2) untersucht (s. Anhang).

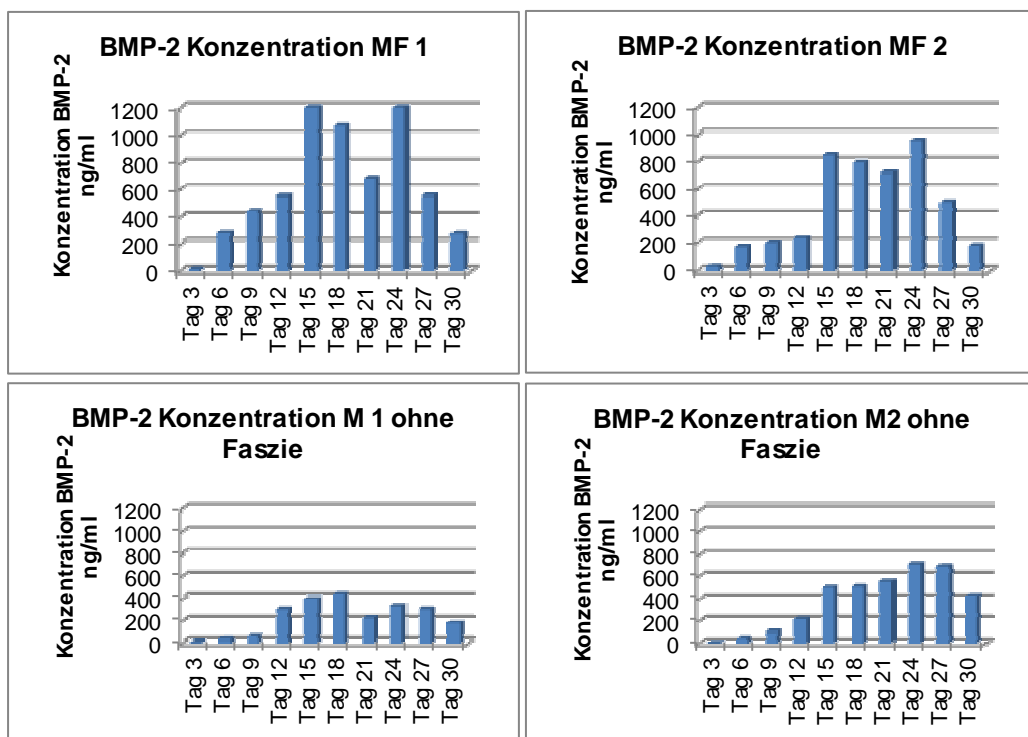


Abbildung 39: ELISA 1. Vergleich der BMP-2-Konzentrationen von transduziertem Muskelgewebe mit anliegender Faszie (MF 1 und MF 2) und von transduzierten reinen Muskelgewebestücken (M1 und M2).

Die Expression von BMP-2 lag im Mittel zu allen Messzeitpunkten bis auf Tag 27 und 30 von faszienshaltigen Muskelstückchen über der von reinen Muskelproben. An Tag 15 und Tag 24 kam es in beiden Fällen zu Höchstmengen in der BMP-2-Produktion. Die beiden „Gipfel“ sind durch eine kurzzeitige Abnahme mit anschließendem BMP-2-Anstieg getrennt. Insgesamt kam es ab Tag 24 in beiden Gruppen zu einer Abnahme der BMP-2-Konzentration in den Überständen. Die Transduktion

faszienhaltigen Muskelgewebes scheint daher erfolgreicher zu sein als die von reinem Muskelgewebe. Eine Funktionsfähigkeit des Vektors wurde somit nachgewiesen und die Methodik der Entnahme von Muskelproben mit anliegender Faszie zur Durchführung der Transduktion und Reimplantation in den Defekt bestärkt.

ELISA 2

Die Langzeitevaluation der BMP-2-Produktion über 33 Tage lieferte folgendes Ergebnis.

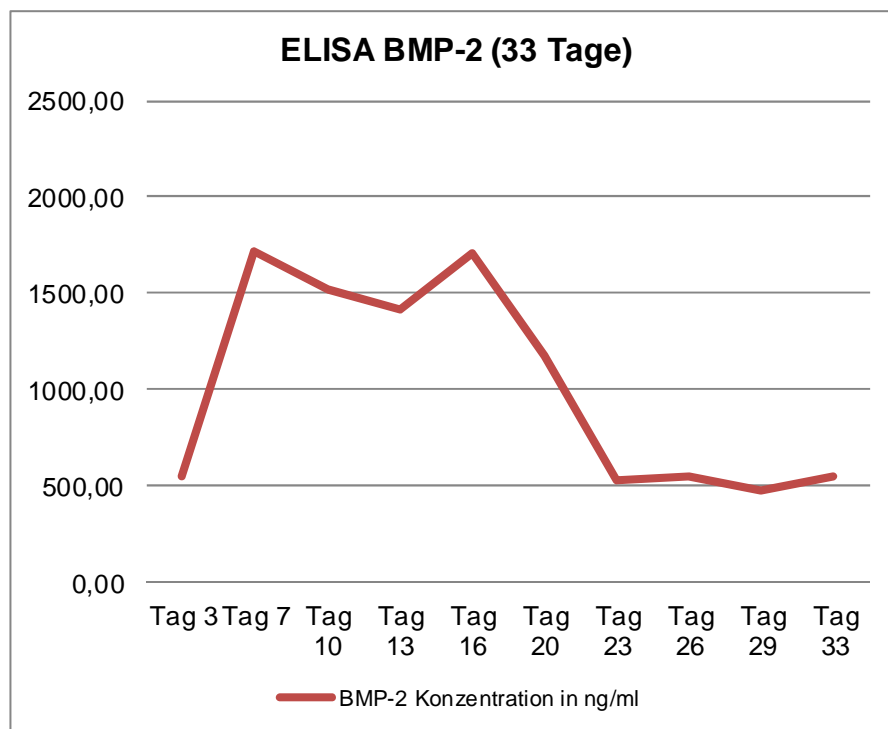


Abbildung 40: Gemessene BMP-2-Konzentrationen im Medium über 33 Tage hinweg mittels ELISA

Über den gesamten Messzeitraum hinweg war eine BMP-2-Konzentration messbar. Zwischen Tag 7 und Tag 16 war die BMP-2-Expression am höchsten, bis sie ab Tag 16 wieder abnahm. Selbst am Tag 33 war noch eine mittlere BMP-2-Konzentration von ca. 545 ng/ml vorhanden. Zwischen den Proben herrschten jedoch relativ große Unterschiede in der Konzentration von BMP-2, was sich in den hohen Standardabweichungen niederschlug (s. Anhang).

ELISA 3

Jeweils zwei zusätzliche Muskelproben von allen Tieren der M Ad.BMP-2 (180)-Gruppe wurden transduziert und 12 Tage bei 37 °C kultiviert. Die BMP-2-Expression stieg bis zum Tag 12 stetig an, wobei die größte Zunahme in den ersten Tagen erfolgte (Vervierfachung der BMP-2-Konzentration von Tag 3 auf Tag 6). Die Datentabelle und Grafik zu den einzelnen Proben der Tiere 85-92 finden sich im Anhang.

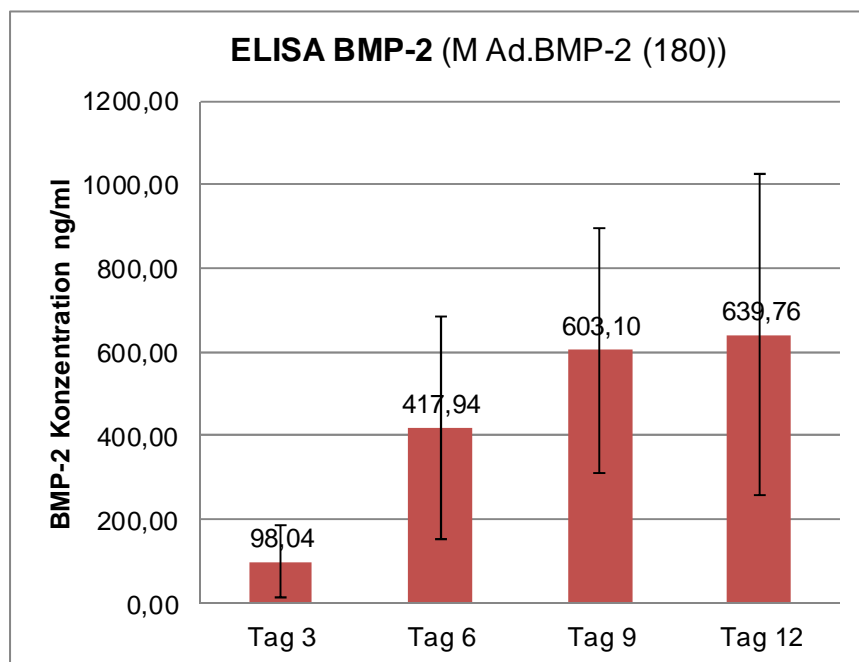


Abbildung 41: Ergebnis des ELISA der Proben von M Ad.BMP-2 (180). Die mittlere BMP-2-Konzentration im Medium stieg konstant an, die höchste Zunahme erfolgte aber in den ersten Tagen.

2. Makroskopische Beurteilung

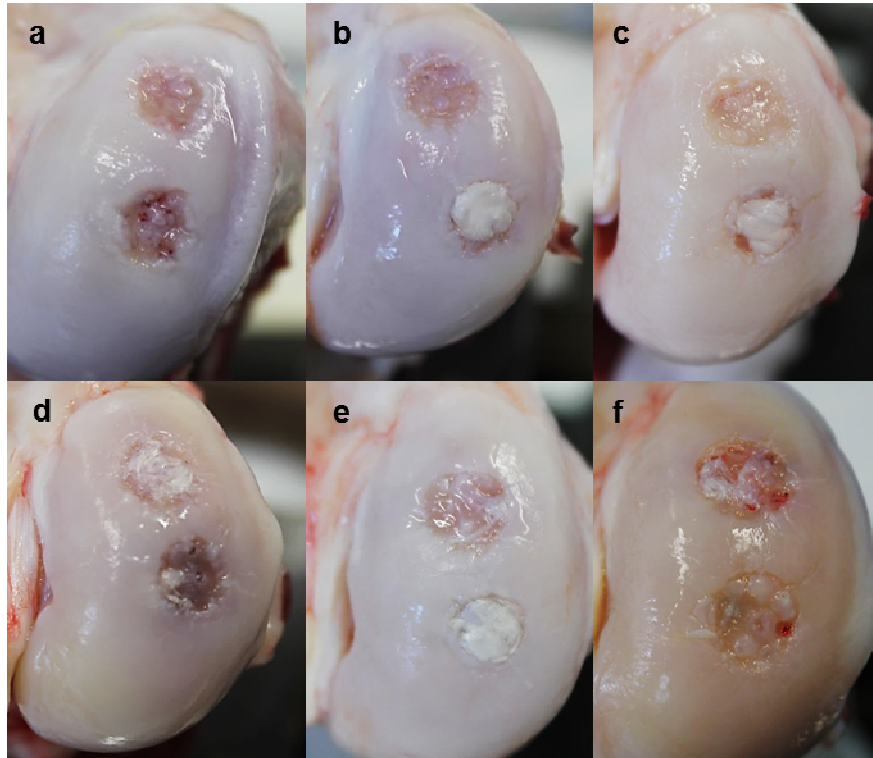


Abbildung 42: (a) Gruppe L. Inselbildung im Bereich der Bohrlöcher in beiden Defekten. Marginal hyalinartiges Knorpelgewebe sichtbar. (b) Gruppe M (120). Oben Inselbildung im Bereich der Bohrlöcher; unten flächig weiße Füllung mit deutlichem Randgebiet. (c) Gruppe M (180). Oben geringgradige Inselbildung; unten flächige weiße Füllung. (d) Gruppe M Ad.BMP-2 (120). Oben netzartige weiße Gewebeformation; unten vorwiegend leer mit einzelnen Gewebeinseln. (e) Gruppe M Ad.BMP-2 (120). Oben netzartige Verbindung der Gewebeinseln um die Bohrlöcher; unten flächig gefüllt mit weißem, undurchsichtigem Gewebe. (f) Gruppe M Ad.BMP-2 (180). Beide Defekte mit deutlicher Inselbildung im Bereich der Bohrlöcher.

Die makroskopische Obduktion der Femurkondylen direkt nach der Freipräparation ergab insgesamt ein sehr heterogenes Erscheinungsbild, so dass ein uniformes, „gruppentypisches“ Aussehen der ehemaligen chondralen Defekte nicht eindeutig zuzuordnen war. In Abb. 42 wurde dennoch versucht, die am häufigsten sichtbaren Veränderungen pro Gruppe abzubilden.

Bei der Leerdefektgruppe L ergab sich ein größtenteils einheitliches Bild. Es fanden sich im ehemaligen Defektgebiet vorwiegend große weißlich-glänzende Gewebeinseln im Bereich der Bohrlöcher sowie hyalinartiges von den Rändern her einwachsendes Gewebe. Eine komplette Füllung der Defekte war nie zu beobachten.

Die mit Muskelfaszien behandelten Defekte mit der Standzeit von 120 Tagen (M (120)) wiesen ein teilweise anderes Erscheinungsbild auf als Kontrollgruppe L. So fand sich hier oftmals eine fast geschlossene Bedeckung des Defektgebietes mit weißem, undurchsichtigem Gewebe. Der Randbereich der Defekte war meist deutlich zu erkennen und ungefüllt. Daneben kam es auch hier oft zu Inselbildungen im Bereich der ehemaligen Bohrlöcher. Vereinzelt waren die Defekte komplett ungefüllt, wobei das neue Gewebe zum anliegenden gesunden Knorpel durch einen deutlichen Rand scharf abgegrenzt war.

Das makroskopische Bild der Defekte innerhalb der BMP-2-Gruppe M Ad.BMP-2 (120) unterschied sich wiederum von den erstgenannten Gruppen. Zwar kam es auch hier oftmals (ca. 1/3 der Defekte) zu einer Inselbildung im Bereich der Bohrlöcher mit weißlich glänzendem Gewebe, jedoch kam es bei einem weiteren 1/3 der Defekte zu einer netzartigen Verbindung der ehemaligen Bohrkanäle mit weißlich-durchsichtigem Gewebe. Die übrigen Defekte erschienen meist ungefüllt bzw. waren vereinzelt flächig bedeckt mit weißem, undurchsichtigem Gewebe ähnlich zur Gruppe M (120).

Für die Gruppen M und M Ad.BMP-2 mit der Standzeit von 180 Tagen (M (180) und M Ad.BMP-2 (180)) ergab sich ein ähnliches Bild zu den entsprechenden Gruppen mit einer Standzeit von 120 Tagen. Die mit unmodifiziertem Muskelfasziengewebe behandelten Defekte wiesen zu 2/3 ebenfalls eine Inselbildung von weißlich-durchsichtigem Gewebe auf, der Rest war flächig weiß gefüllt oder selten ganz leer. Die mit BMP-2-Gentransplantaten therapierten Knorpeldefekte erschienen meist unregelmäßig gefüllt. Es kam in den meisten Fällen zur typischen, im Gegensatz zur BMP-2-Gruppe mit der kürzeren Standzeit von 120 Tagen aber zur etwas größeren Inselbildung im Bereich der Bohrlöcher. Selten waren die Defekte großflächig bedeckt oder komplett ungefüllt.

3. Biomechanik

3.1. Messung nach makroskopischer Beurteilung

Die Auswertung der Versuchsgruppen L, M (120), M Ad.BMP-2 (120) und

M Ad.BMP-2 (180) erfolgte jeweils getrennt für die Messungen auf Gewebe und auf nicht gefüllte Stellen im Defektbereich. Komplette gefüllte als auch gänzlich leere Defektbereiche wurden ebenso den Gewebemessungen zugeordnet, da sie als signifikant für diesen Defekt galten.

Steifigkeit N/mm Mittelwerte ± Standardabweichung	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus	4. Zyklus	5. Zyklus
Standzeit 120 Tage					
KL (120)	16,99 ± 4,64	22,13 ± 6,71	24,28 ± 7,31	25,69 ± 7,53	26,97 ± 7,76
L (120) Gewebe	16,11 ± 6,23	31,55 ± 11,06	36,82 ± 10,50	38,54 ± 10,19	39,63 ± 10,08
L (120) leer	45,12 ± 21,12	53,09 ± 8,83	53,16 ± 8,82	53,53 ± 8,72	53,42 ± 8,48
M (120) Gewebe	20,54 ± 9,21	43,55 ± 9,33	47,18 ± 7,73	47,19 ± 6,84	48,02 ± 4,19
M (120) leer	55,04 ± 2,86	55,86 ± 3,50	56,29 ± 3,36	56,23 ± 3,43	55,71 ± 1,53
M Ad.BMP-2 (120) Gewebe	29,21 ± 19,02	47,24 ± 10,54	49,58 ± 7,46	50,56 ± 5,60	51,52 ± 3,29
M Ad.BMP-2 (120) leer	53,93 ± 7,17	53,73 ± 7,27	53,32 ± 5,50	52,36 ± 4,53	51,71 ± 4,85
Standzeit 180 Tage					
KL (180)	16,76 ± 1,50	21,58 ± 2,46	23,49 ± 2,59	25,16 ± 2,97	26,92 ± 3,26
M Ad.BMP-2 (180) Gewebe	20,04 ± 4,26	41,59 ± 7,97	46,50 ± 6,84	48,81 ± 5,88	49,91 ± 5,51
M Ad.BMP-2 (180) leer	41,65 ± 14,55	49,10 ± 11,94	50,24 ± 11,44	50,66 ± 10,52	50,40 ± 11,05

Tabelle 3: Ergebnisse der Indentationstests nach makroskopischer Beurteilung. Die niedrigsten Steifigkeiten wiesen jeweils die nativen Knorpelproben (KL = kontralateral) auf. Die Steifigkeitswerte unterlagen von Zyklus zu Zyklus einer kontinuierlichen Zunahme.

Der Steifigkeitsverlauf über fünf Zyklen zeigte gruppenübergreifend eine Zunahme der Steifigkeit von Zyklus zu Zyklus.

Standzeit 120 Tage

Die niedrigsten Steifigkeitswerte ergaben sich für die gesunden Knorpelproben der jeweils kontralateralen Seite (26,91 N/mm bzw. 26,92 N/mm im Zyklus 5). Lediglich der Steifigkeitswert der unbehandelten Gruppe auf Gewebe (16,11 N/mm) lag im ersten Zyklus noch unter denen der nativen Proben.

Den Steifigkeitswerten der nativen Knorpel kamen die Werte der Defekte,

die unbehandelt blieben (L), am nächsten. Die Gewebemessungen der muskelfaszienbehandelten Defekte erzielten in jedem Zyklus eine niedrigere Steifigkeit als Defekte unter BMP-2-Therapie und lagen so näher an Werten der gesunden Kontrollen.

Die höchsten Steifigkeiten ergaben sich bei Messungen der ungefüllten Defektbereiche, wobei die höchste Steifigkeit aller Gruppen mit einer Standzeit von 120 Tagen die rein muskelfaszienbehandelte Gruppe aufwies.

Alle Proben der Versuchsgruppen, egal ob im gefüllten oder ungefüllten Bereich, unterschieden sich in Zyklus 5 hochsignifikant in ihrer Steifigkeit vom gesunden kontralateralen Knorpel ($p \leq 0,001$). Die Ergebnisse der Gewebemessungen von M Ad.BMP-2 und L zeigten untereinander noch einen deutlich signifikanten Unterschied in der Steifigkeit ($p = 0,007$), die übrigen Messungen in Gewebe zeigten untereinander keinen statistischen Unterschied mehr. Die Steifigkeitswerte in den leeren Defektbereichen unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,653$). Der Vergleich zwischen Gewebe- und Leermessung ergab ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Steifigkeit ($p = 0,089$).

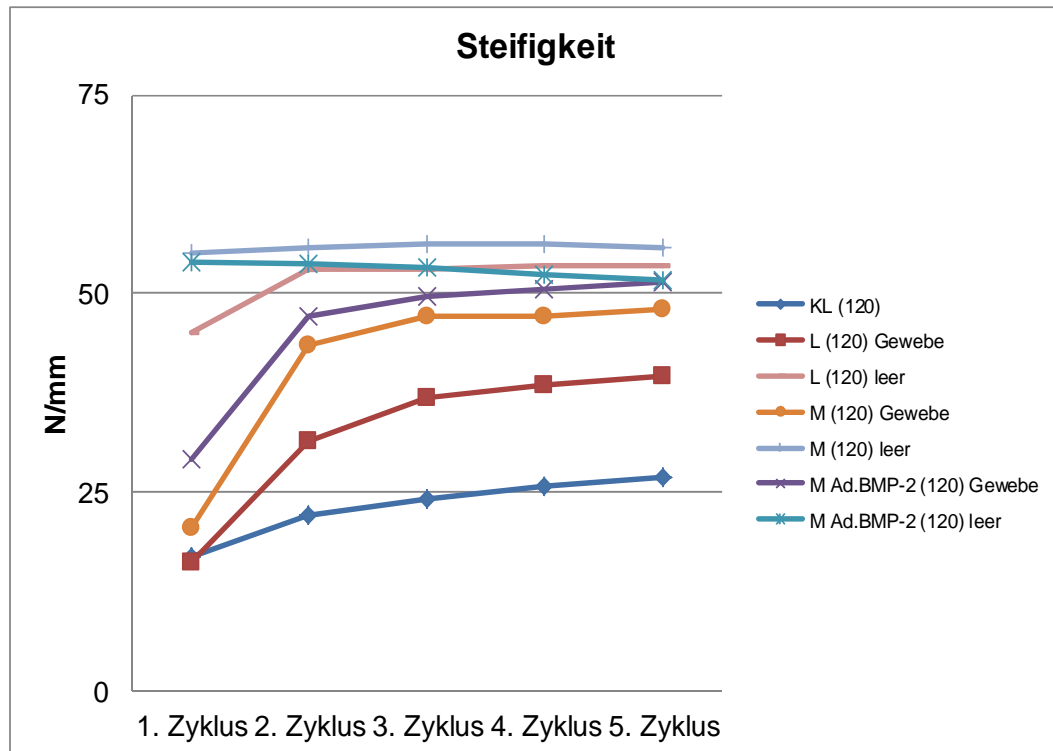


Abbildung 43: Steifigkeitswerte über fünf Zyklen. Zu sehen sind die Werte der Gruppen KL, L, M und M Ad.BMP-2 mit einer Standzeit von 120 Tagen.

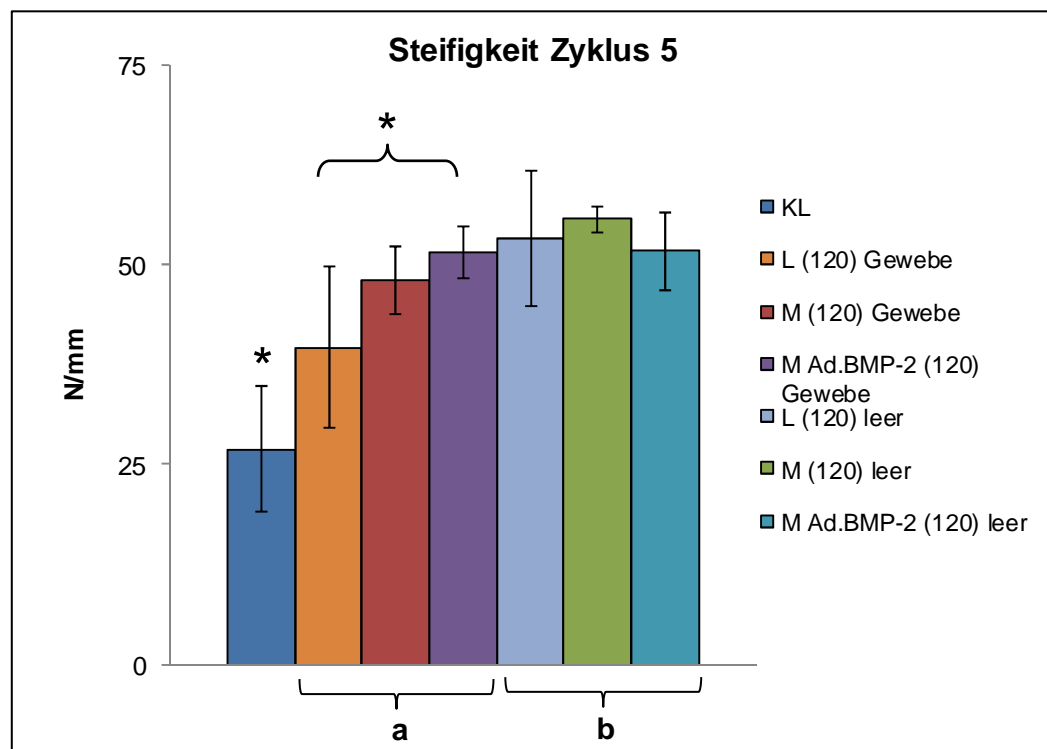


Abbildung 44: Steifigkeitswerte aus Zyklus 5 für die Gruppen KL, L, M, M Ad.BMP-2 der kürzeren Standzeit von 120 Tagen; jeweils nach Gewebe- und Leermessung getrennt. (a) Ergebnisse der Messung auf Gewebe (b) Ergebnisse der Messungen im ungefüllten Defektbereich.

Standzeit 180 Tage

Die Steifigkeitswerte stiegen auch hier stetig an. Auffällig hier ist die zu Beginn sehr niedrige Steifigkeit in Zyklus 1 an Orten mit Gewebeneubildung (M Ad.BMP-2 (180) Gewebe), die sich im Verlauf immer stärker der Steifigkeit an Stellen ohne erkennbare Gewebekonstruktion annäherte und schließlich in Zyklus 5 fast denselben Wert aufwies.

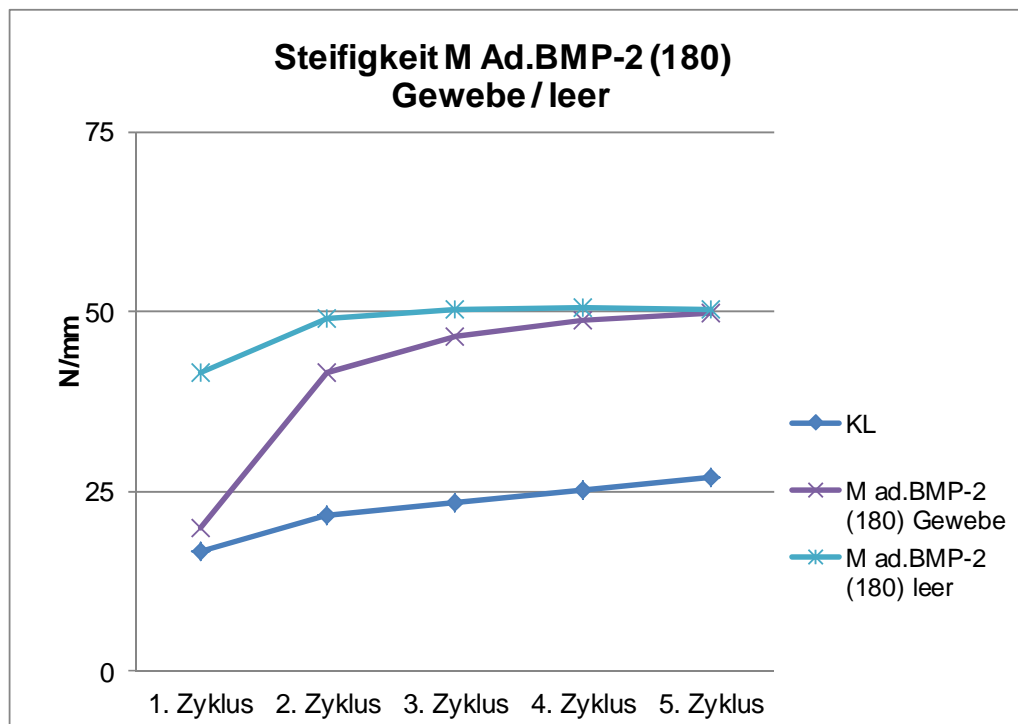


Abbildung 45: Verlauf der Steifigkeitswerte für die Gruppe M Ad.BMP-2 (180) mit der Standzeit von 180 Tagen im Vergleich zu gesundem Knorpel (KL).

Die Werte für M Ad.BMP-2 (180) für Stellen mit Gewebeneubildung als auch mit fehlender Defektfüllung lagen bis auf Zyklus 1 signifikant über den Werten von gesundem Knorpel (M Ad.BMP-2 (180) Gewebe vs. KL: $p=0,002$; M Ad.BMP-2 (180) leer vs. KL: $p=0,005$)

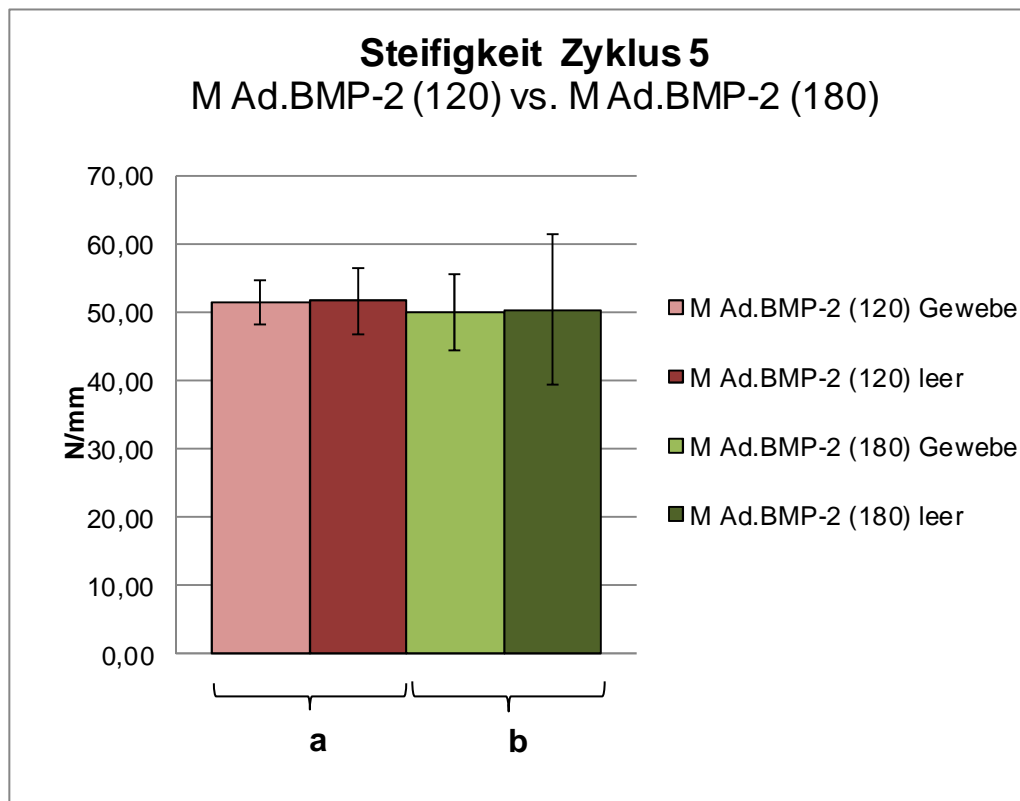
Standzeit 180 Tage vs. 120 Tage: M Ad.BMP-2 (180), M Ad.BMP-2 (120)

Abbildung 46: Steifigkeiten im Zyklus 5 der BMP-2 muskelbehandelten Gruppen für unterschiedliche Standzeiten; (a) Standzeit 120 Tage (b) Standzeit 180 Tage.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Steifigkeit zwischen der kürzeren und der längeren Standzeiten der Versuchsgruppen mit BMP-2 gentransduzierten Muskelfaszienstücken sowohl im ungefüllten Bereich als auch im Bereich von Gewebeneubildung ($p=0,7336$).

3.2. Fünf-Punkt-Messung

Für jeden Zyklus wurden die Steifigkeitswerte für jede Gruppe bei den entsprechenden fünf Messorten gemittelt und statistisch mithilfe des Mann-Whitney-U-Test ausgewertet.

Steifigkeit N/mm Mittelwerte ± Standardabweichung	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus	4. Zyklus	5. Zyklus
KL (180)	17,45 ± 4,70	23,20 ± 7,53	25,20 ± 8,54	26,52 ± 8,82	27,40 ± 8,96
M (180)	28,26 ± 15,45	41,66 ± 10,72	43,90 ± 10,34	44,65 ± 10,47	44,88 ± 10,55
M Ad.BMP-2 (180)	28,04 ± 14,29	43,62 ± 10,16	46,29 ± 9,67	46,85 ± 9,47	48,03 ± 9,19

Tabelle 4: Ergebnisse der Fünf-Punkt-Messungen für die Gruppen KL (180), M (180) und M Ad.BMP-2 (180); Gemittelte Steifigkeitswerte in N/mm und Standardabweichung in N/mm. Die Werte aus Zyklus 5 dienten zur statistischen Auswertung.

Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,121$) zwischen den Versuchsgruppen M (180) und M Ad.BMP-2 (180), jedoch einen statistisch hoch signifikanten Unterschied zu gesundem Knorpel (KL) in Zyklus 5 (M (180) vs. KL $p\leq 0,001$ und M Ad.BMP-2 (180) vs. KL $p\leq 0,001$) (s. Tabelle 4).

Für alle getesteten Proben ergab sich ein kontinuierlicher Anstieg der Steifigkeiten von Zyklus 1 bis Zyklus 5, wobei die Zunahme zwischen den ersten beiden Zyklen stets am größten war.

Zunahme der Steifigkeit in %	Von Zyklus 1 zu 2	Von Zyklus 1 zu 5
KL	33%	57%
M (180)	47%	59%
M Ad.BMP-2 (180)	56%	71%

Tabelle 5: Zunahme der Steifigkeitswerte für die Gruppen KL, M und M Ad.BMP-2 nach 180 Tagen Beobachtungszeit in %; Die Zunahme der Steifigkeit war für M Ad.BMP-2 am höchsten, gefolgt von den muskelbehandelten Defekten. Gesunder Knorpel wies den niedrigsten Anstieg der Steifigkeitswerte auf.

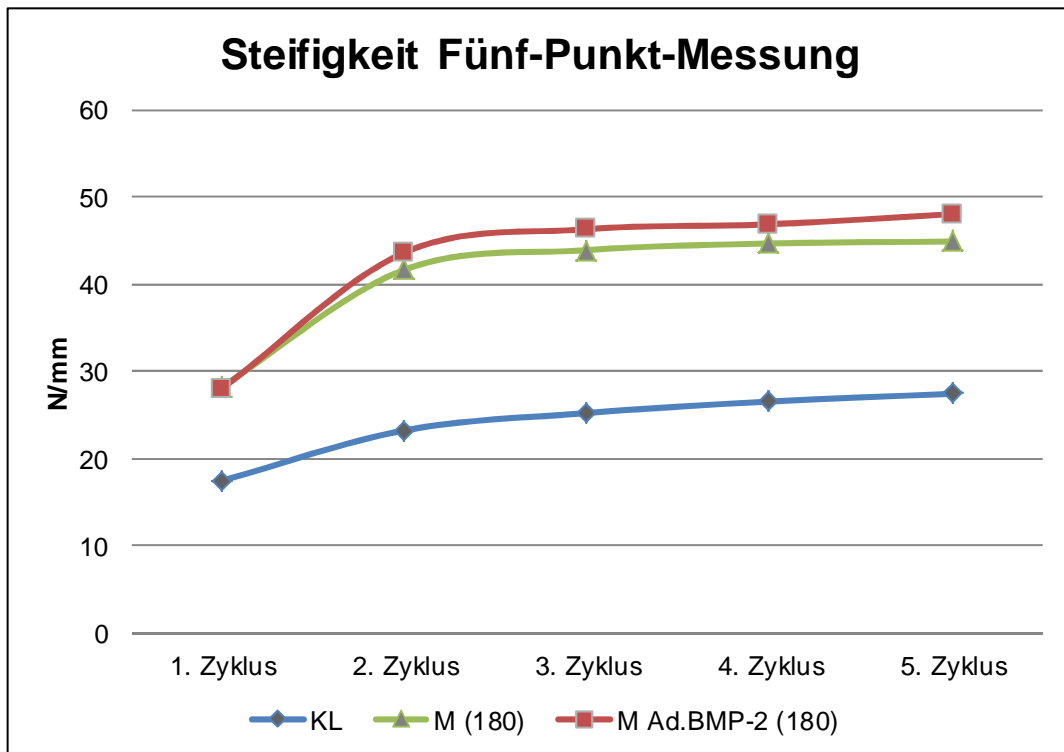


Abbildung 47: Steifigkeitswerte der Gruppen KL, M (180) und M Ad.BMP-2 (180) über fünf Zyklen. Für jede Gruppe ist ein kontinuierlicher Anstieg der Steifigkeitswerte zu verzeichnen.

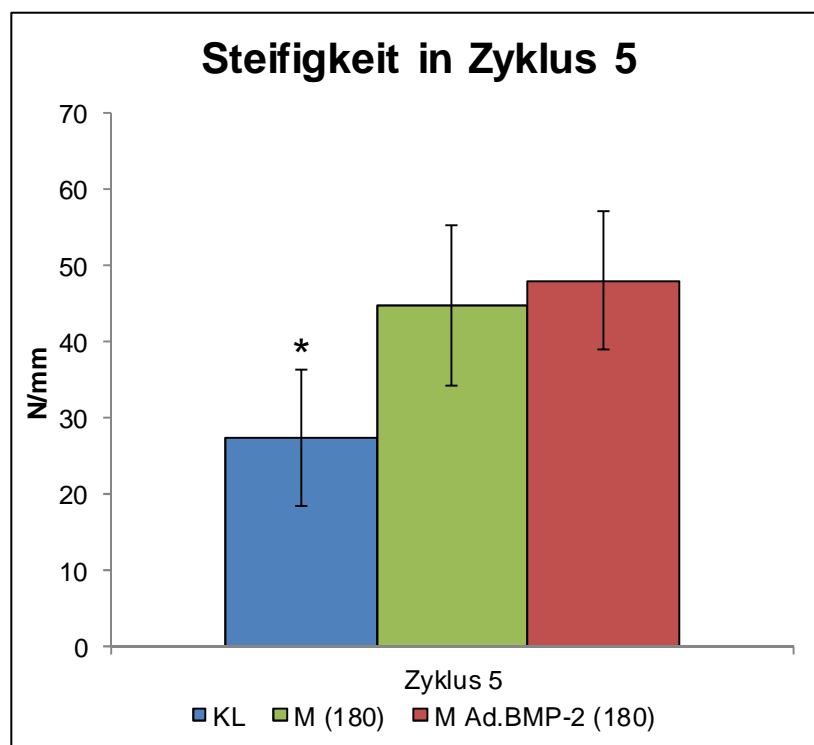


Abbildung 48: Steifigkeitswerte der Gruppen KL (27,40 N/mm), M (180) (44,88 N/mm) und M Ad.BMP-2 (180) (48,03 N/mm) im fünften Zyklus. Die rein muskel- als auch die BMP-2-behandelten Defekte zeigten einen signifikanten Unterschied zu nativem Knorpelgewebe ($p \leq 0,001$), jedoch keinen signifikanten Unterschied untereinander ($p = 0,121$).

4. Histologische Auswertung

Nachfolgend werden exemplarisch histologische Schnitte aus dem Defektbereich für jede Gruppe dargestellt. Zu sehen sind jeweils Safranin-Orange/Lichtgrün gefärbte Präparate in den Vergrößerungen 25x und 100x, sowie auf Kollagen Typ I und Typ II immunhistologisch angefärbte Schnitte in der Vergrößerung 25x. Die gezeigten Präparate wurden beispielhaft für die jeweilige Versuchsgruppe ausgewählt, jedoch ergab sich innerhalb der Gruppen jeweils ein sehr heterogenes Erscheinungsbild. So ließ sich von hyalinartigem Reparaturgewebe über fibrocartilaginöse Strukturen, bis hin zu bindegewebigen Ausbildungen ein sehr vielfältiges morphologisches Bild feststellen. Auch leere Defektstellen mit reinem subchondralen Knochen an der Oberfläche waren vorhanden.

Nach Abbildung beispielhafter histologischer Aufnahmen erfolgt die semiquantitative Auswertung mithilfe des erweiterten O'Driscoll-Scores.

4.1. Leerdefekte nach Pridie-Bohrung

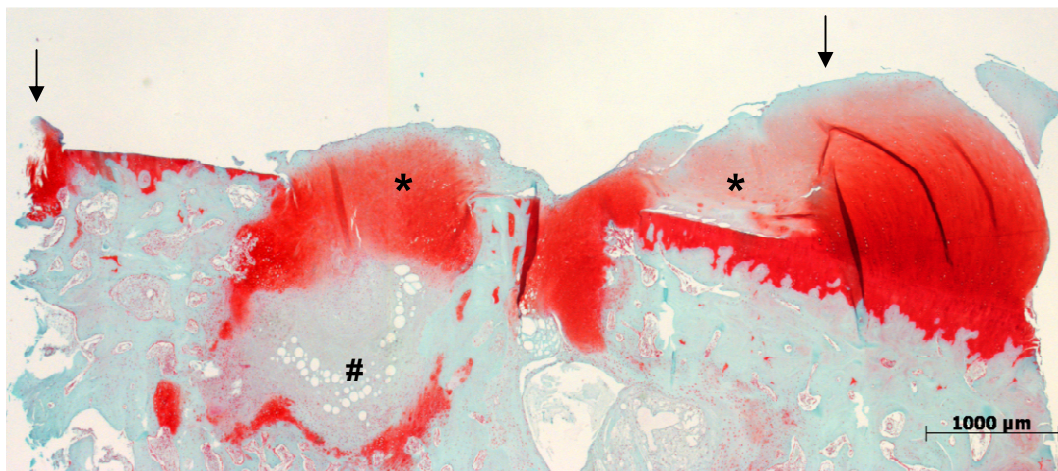


Abbildung 49: Übersichtsaufnahme (25x Vergrößerung) eines Safranin-Orange/Lichtgrün gefärbten Schnittes durch das Zentrum eines Defekts der Leerdefektgruppe. Die ehemalige Defektzone ist noch gut erkennbar (Pfeile), besonders rechtsseitig ist die unterschiedlich starke Rotfärbung deutlich. Linksseitig ist das Ende des Defektbereichs leicht abgeschnitten. Die Oberfläche ist durchweg unregelmäßig aufgeworfen. Mittig und im rechten Randbereich ist neues, unvollständig differenziertes Reparaturgewebe zu sehen. Die schwach rötliche Färbung lässt auf einen hohen, knorpeltypischen Proteoglykan-Gehalt schließen (Sternchen). Linksseitig ist keine Defektfüllung vorhanden-hier liegt subchondraler Knochen frei. Auffällig sind außerdem zystenartige Strukturen innerhalb der Knochenschicht (Raute).

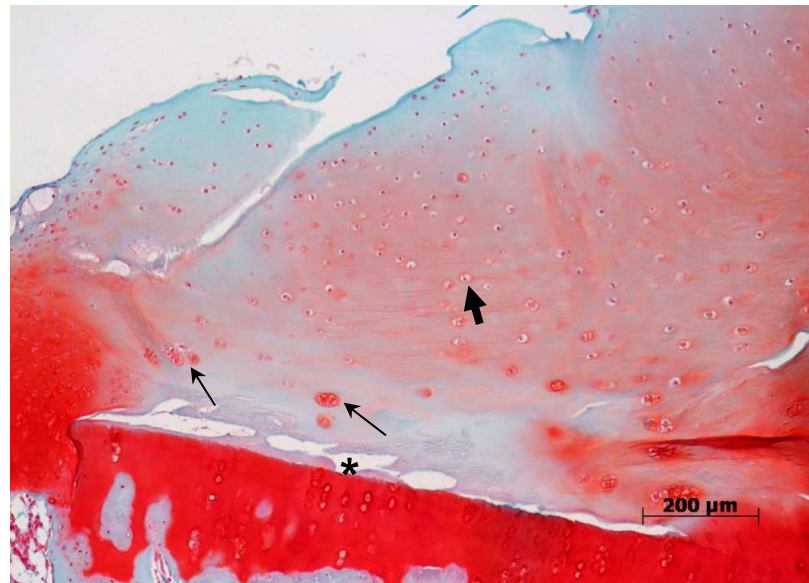


Abbildung 50: Detailaufnahme aus der Region des neu gebildeten Reparaturgewebes aus Abbildung 49 (Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung, 100x Vergrößerung). Zu erkennen sind einzelne, in Lakunen angesiedelte Chondrozyten (dicker Pfeil). In tiefer gelegenen Zonen sind Chondrozytencluster (dünne Pfeile) zu sehen. Die schwach rötliche Färbung der EZM deutet auf das Vorhandensein von Proteoglykanen hin, was spezifisch für hyalines Knorpelgewebe ist. Die Anbindung des knorpeligen Gewebes an die subchondrale Knochenplatte ist lückenhaft (Sternchen).



Abbildung 51: Kollagen Typ II-Färbung (25x Vergrößerung) des Präparates aus Abbildung 49. Nachweis von Kollagen Typ II vor allem im rechten Randbereich (nativer Knorpel) und zu einem hohen Teil innerhalb des neu gebildeten Gewebes (Sternchen). In tieferen Schichten innerhalb des Knochens ist ebenfalls knorpelspezifisches Kollagen Typ II nachweisbar (Pfeil).

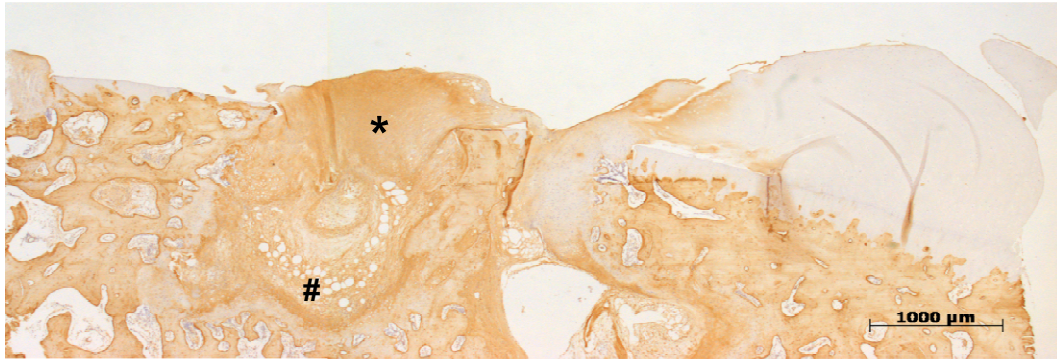


Abbildung 52: Übersichtsaufnahme (25x Vergrößerung) der Kollagen Typ I-Färbung. Das bräunlich erscheinende Kollagen Typ I-positive Gewebe, welches man regelhaft in Knochengewebe und Faserknorpel vorfindet, ist innerhalb des Reparaturgewebes flächig vorhanden (Sternchen). Das knöcherne Trabekelnetzwerk scheint zentral unterhalb des ehemaligen Defektbereichs aufgelöst (Raute).

4.2. Mit nativem Muskelfasziengewebe behandelte chondrale Defekte (M (120) und M (180))

Gruppe M (120)

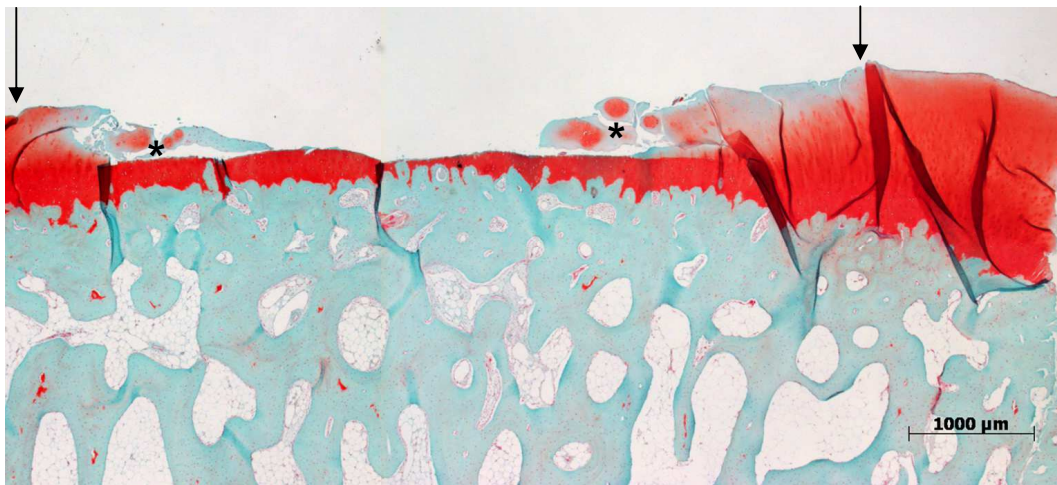


Abbildung 53: Übersichtsdarstellung des ehemaligen Defektbereichs eines mit reinem Muskelfasziengewebe behandelten Defekts der M (120) Gruppe (Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung, Schnittebene 1,5 mm parazentral, 25x Vergrößerung). Das ehemalige Defektgebiet ist durch Pfeile gekennzeichnet. Mittig der Defektzone ist keine Füllung erkennbar. In den Randbereichen der ehemaligen Läsion sind aufgeworfene, nicht mit der kalzifizierten Knorpelschicht verbundene Gewebeneubildungen (Sternchen) zu sehen. Darin sichtbar sind ausgeprägte Chondrozytencluster.

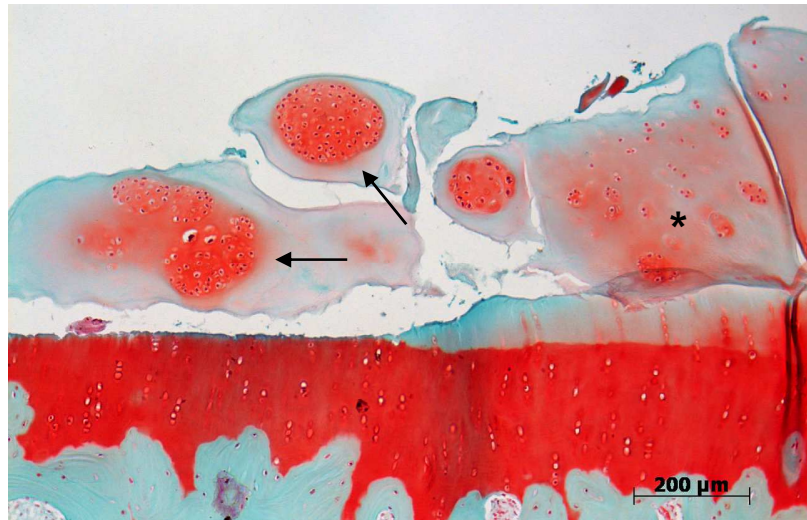


Abbildung 54: Detailaufnahme aus der Region des neu gebildeten Gewebes aus Abb. 53 (Safranin-Orange/Lichtgrün, 100x Vergrößerung). Das Reparaturgewebe ist deutlich von der kalzifizierten Knorpelschicht abgetrennt. Darin finden sich große Chondrozytenanhäufungen (Clusterbildung) (Pfeile). Die sehr schwach rötliche Anfärbung der Matrix weist auf einen sehr geringen Anteil an Proteoglykanen hin (Sternchen).



Abbildung 55: Übersichtsdarstellung einer Kollagen Typ II-Färbung des in Abb. 53 gezeigten Bereiches (25x Vergrößerung). Kollagen Typ II ist in den „Gewebeinseln“ flächig nachweisbar (Sternchen).

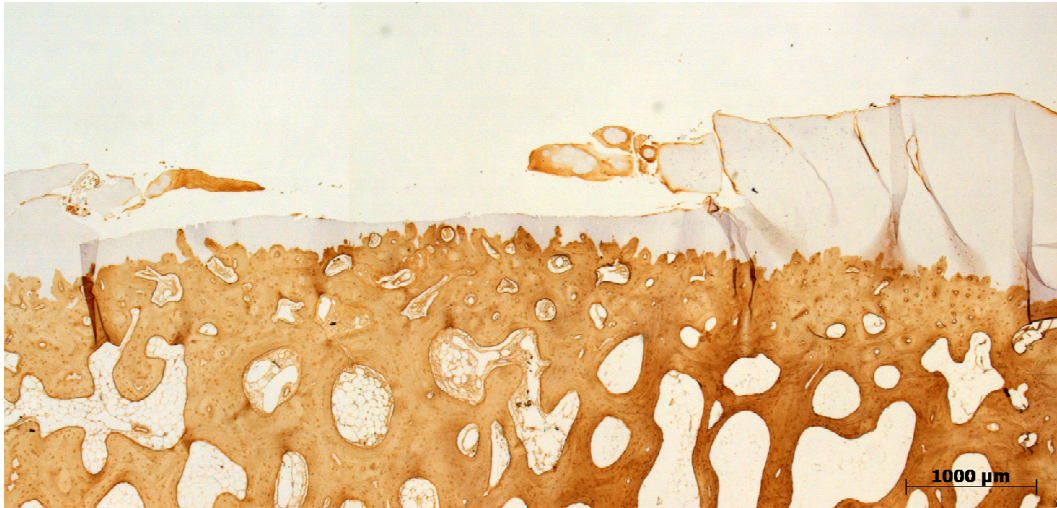


Abbildung 56: Übersichtsdarstellung des ehemaligen Defektbereichs aus Abb. 53 als Kollagen Typ I-Färbung (25x Vergrößerung). Im Reparaturgewebe links und rechts am Defektrand ist Kollagen Typ I in geringem Maße nachweisbar.

Gruppe M (180)

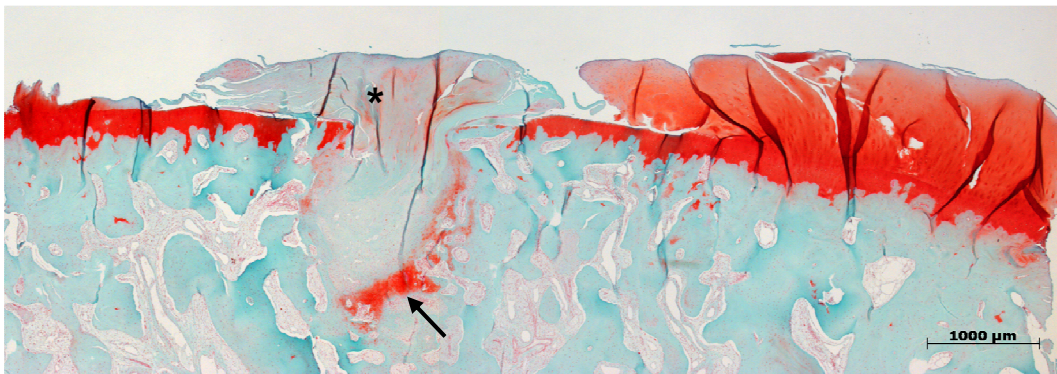


Abbildung 57: Übersichtsaufnahme der Defektzone eines mit reinem Muskelgewebe behandelten Defektes nach einer Standzeit von 180 Tagen (Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung, zentrale Schnittebene, 25x Vergrößerung). Die Zone des mineralisierten Knorpels ist mittig unterbrochen durch ein faserknorpeliges Gewebe, welches sich in die Tiefe bis in den Bereich der Knochentrabekel fortsetzt. Dort finden sich deutlich rot gefärbte Anteile (Pfeil). An der Oberfläche ist ein pilzartig aufgeworfenes, geringgradig rötlich angefärbtes Gewebe (Sternchen) zu sehen, welches in der Höhe fast den nativen Knorpel (rechter Bildrand) erreicht. Insgesamt ist der ehemalige Defekt unregelmäßig gefüllt.

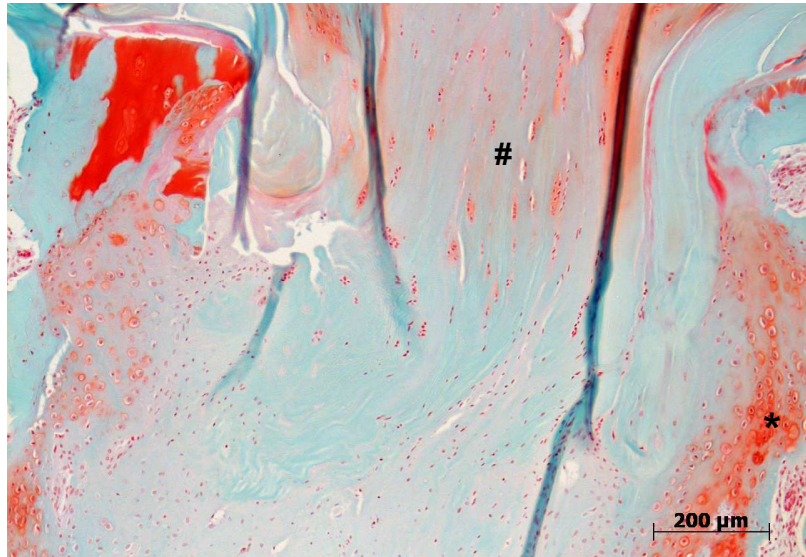


Abbildung 58: Detailaufnahme aus der Mitte des Ersatzgewebes aus Abb. 57 (Safranin-Orange/Lichtgrün, 100x Vergrößerung). Am Rand des Füllgewebes sind unregelmäßig angeordnete, runde, teilweise in Clustern angesiedelte Chondrozyten erkennbar; die rötliche Anfärbung weist auf einen hohen Proteoglykananteil hin (Sternchen). Mittig sind säulenartig angeordnete Chondrozytenanhäufungen zu sehen; die Anfärbbarkeit mit Saf-O ist jedoch nur schwach (Raute).



Abbildung 59: Kollagen Typ II-Färbung des Ausschnitts aus Abb. 57 (25x Vergrößerung). Das Reparaturgewebe zeigt eine geringgradige Kollagen Typ II Anfärbung, in der Tiefe zeigt die ausgeprägte bräunliche Färbung einen hohen Anteil von Kollagen Typ II an (Pfeil).

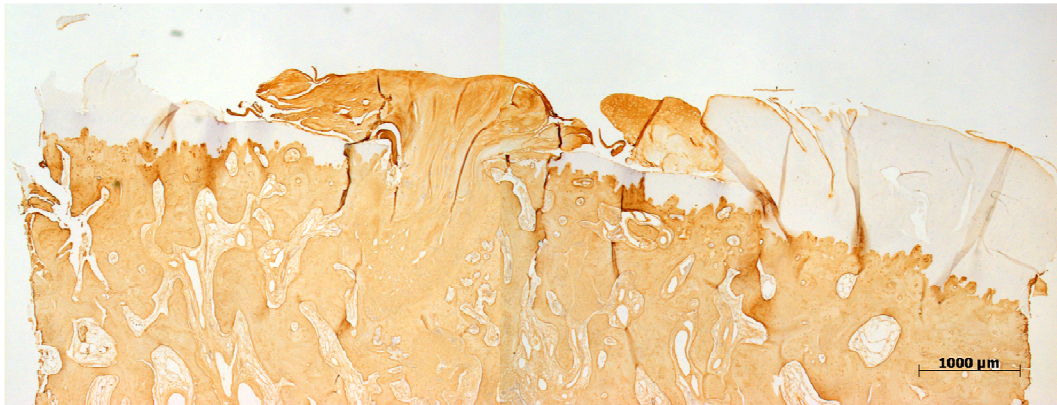


Abbildung 60: Übersichtsaufnahme der Abb. 57 (Kollagen Typ I-Färbung, 25x Vergrößerung). Im gesamten Regenerat ist ein hoher Anteil an Kollagen Typ I als bräunliche Markierung erkennbar.

4.3. Mit BMP-2 genmodifiziertem Muskelfasziengewebe versorgte chondrale Defekte (M Ad.BMP-2 (120) und M Ad.BMP-2 (180))

Gruppe M Ad.BMP-2 (120)



Abbildung 61: Übersichtsaufnahme eines chondralen Defekts, der mit BMP-2 genaktiviertem Muskelfasziengewebe behandelt wurde nach einer Standzeit von 120 Tagen (Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung, 1,5 mm parazentral, 25x Vergrößerung). Rechts ist das Regenerat zum gesunden Knorpel durch eine Fissur abgetrennt (dünner Pfeil). Im Zentrum der Defektzone ist die mineralisierte Knorpelschicht unterbrochen. In der Tiefe der Defektmittle ist versprengtes, stark rot angefärbtes Gewebe erkennbar (Sternchen). An den Defekträndern ist beidseits tiefrot gefärbtes Regenerat zu sehen, welches nicht ganz die Höhe des nativen Knorpelgewebes erreicht (dicke Pfeile).



Abbildung 62: Detailaufnahme aus Abb. 61 (Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung, 100x Vergrößerung). Die EZM ist innerhalb des aufragenden Gewebes stark rot gefärbt, was auf einen sehr hohen, hyalinknorpelspezifischen Gehalt an Proteoglykanen hinweist. In der Matrix fällt die hohe Dichte an Chondrozyten auf, welche im linken Bildausschnitt vermehrt in Clustern lokalisiert sind (Pfeil). Zur Oberfläche hin sind die Knorpelzellen eher horizontal, in tieferen Schichten fast säulenartig angeordnet (Sternchen).

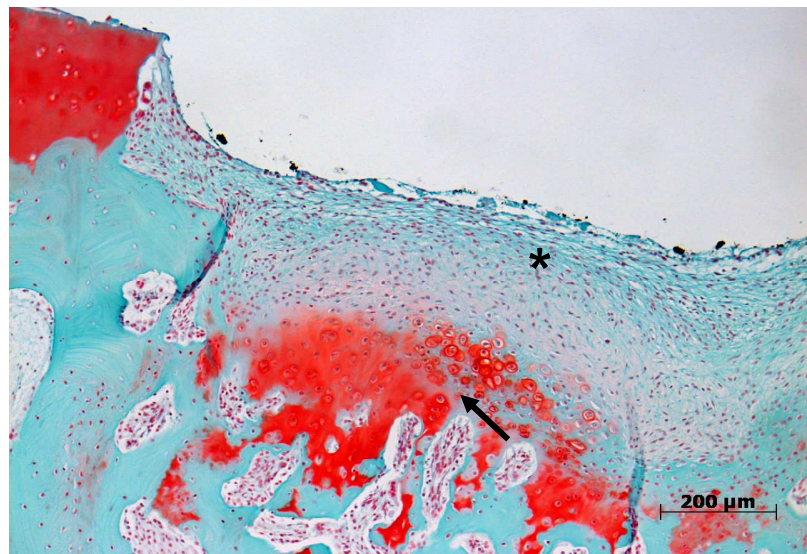


Abbildung 63: Detailsicht des Zentrums der Defektzone aus Abb. 61 (Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung, 100x Vergrößerung). Die Zone des mineralisierten Knorpels wird abrupt unterbrochen. Die Oberfläche wirkt stark eingesunken - das Niveau des Ersatzgewebes liegt etwa auf der Grenze zwischen subchondralem Knochen und kalzifizierter Knorpelschicht. Die stark rote Anfärbung im unteren Bildausschnitt zeugt von hyalinartigen Knorpelstrukturen (sauren Proteoglykanen) mit einer hohen Dichte an einzelnen Chondrozyten (Pfeil). Zur Oberfläche hin finden sich statt Chondrozyten vermehrt Fibrozyten in einem lichtgrün, netzartigen Füllgewebe (Sternchen).



Abbildung 64: Übersichtsaufnahme der Abb. 61 (Kollagen Typ II-Färbung, 25x Vergrößerung). Das Regenerat in den Randbereichen des ehemaligen Defektes besitzt einen hohen Anteil an Kollagen Typ II. Im Zentrum hingegen findet sich nur in den tieferen Schichten (Knochenzone) eine Kollagen Typ II-Markierung.

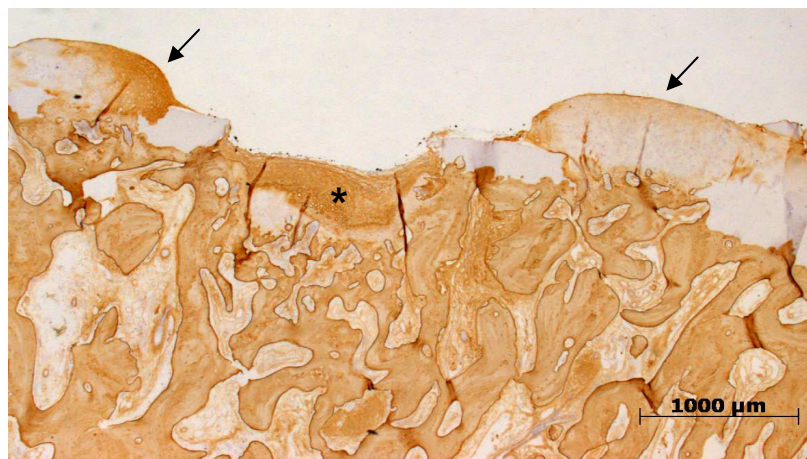


Abbildung 65: Bildausschnitt aus Abb. 61 (Kollagen Typ I-Färbung, 25x Vergrößerung). Es zeigt sich, dass in den Randgebieten neben Kollagen Typ II auch ein geringer Anteil an Kollagen Typ I vorhanden ist (Pfeile). Zentral im Defektgebiet ist flächig faserknorpeltypisches Kollagen Typ I vorhanden (Sternchen).

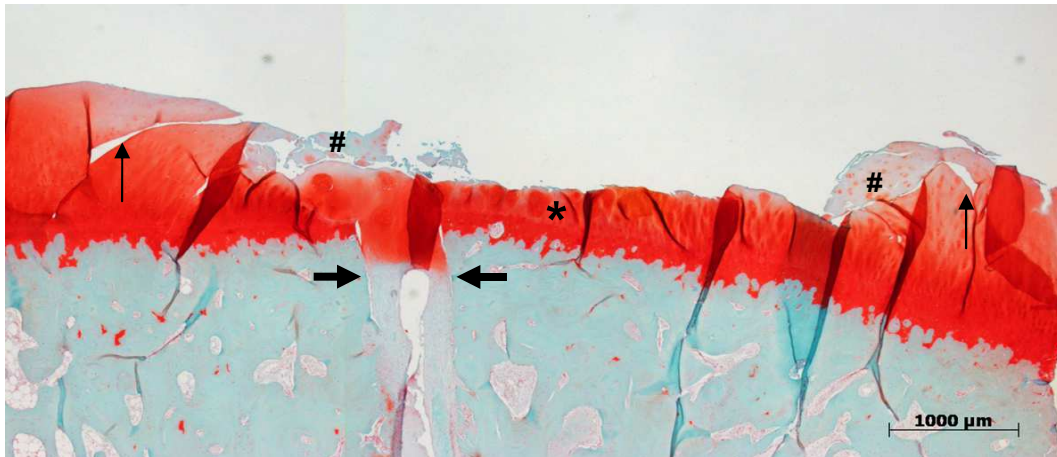
Gruppe M Ad.BMP-2 (180)

Abbildung 66: Übersichtsaufnahme eines mit BMP-2 genmodifiziertem Muskelgewebe versorgten Defekts nach einer Standzeit von 180 Tagen (Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung, 1,5 mm parazentral, 25x Vergrößerung). In der Mitte des ehemaligen Defektgebietes findet sich durchgehend eine dünne Schicht stark rot gefärbten Gewebes (Sternchen). Die Oberfläche erscheint stark aufgeraut. In den Randgebieten sind sehr schwach rot angefärbte, teils abgetrennte Gewebeneubildungen erkennbar, mit rot markierten Chondrozytenclustern (Rauten). Auffällig ist auch die ausgeprägte Fissurbildung (dünne Pfeile). Im Bereich eines ehemaligen Bohrkanals (dicke Pfeile) ist die Tidemark nicht mehr deutlich vorhanden, stattdessen erscheint dieser Bereich herausgelöst von der umgebenden Knochen- und mineralisierten Knorpelschicht.

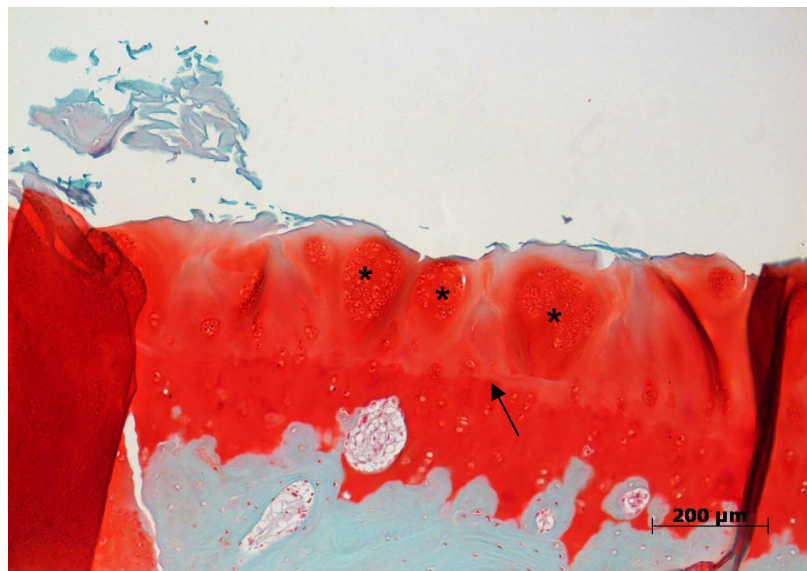


Abbildung 67: Detailaufnahme aus Abb. 66 (Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung, 100x Vergrößerung). Die Grenze zwischen mineralisiertem Knorpel und der tiefen Knorpelschicht ist schwach zu erkennen (*tidemark*) (Pfeil). Dominierend sind die zu großen Clustern angehäuften Chondrozyten (Sternchen). Im linken oberen Bildausschnitt sind zellarme, bindegewebige Strukturen zu sehen.

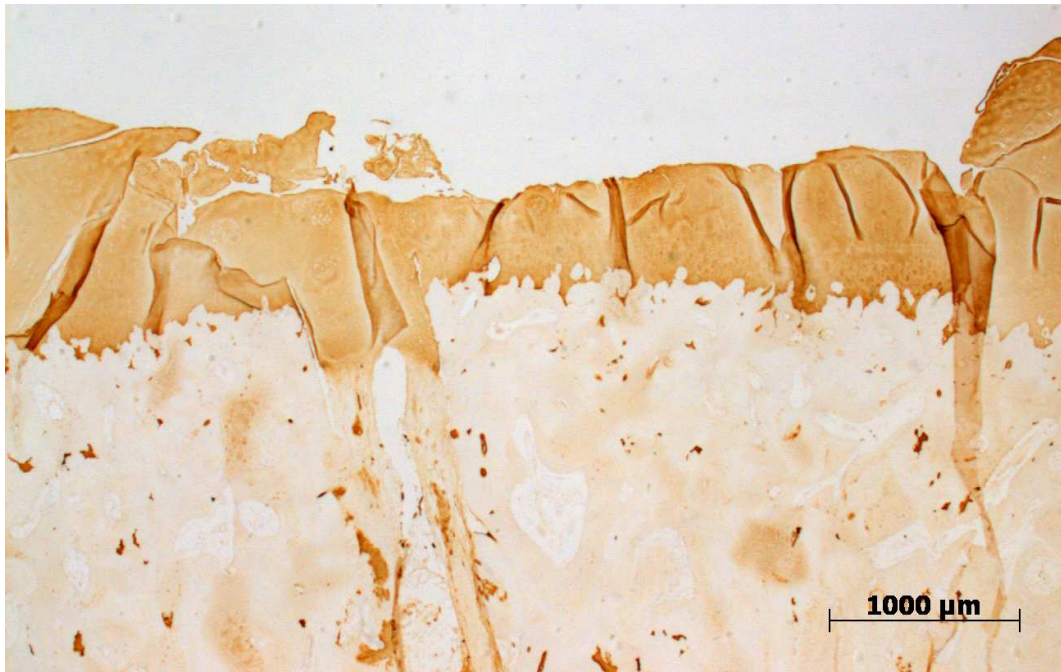


Abbildung 68: Übersichtsaufnahme des Defektbereichs aus Abb. 66 (Kollagen Typ II-Färbung, 25x Vergrößerung). Im gesamten Regenerat ist Kollagen Typ II vorhanden, was auf hyalinartige Knorpelstrukturen hinweist.



Abbildung 69: Übersichtsdarstellung der Abb. 66 (Kollagen Typ I-Färbung, 25x Vergrößerung). Vor allem oberflächlich im Regenerat zeigt sich eine ausgeprägte Markierung von Kollagen Typ I; im Bereich des ehemaligen Bohrkanals ist die bräunliche Färbung aber noch deutlicher, wenn auch nicht so stark wie in der Knochenzone. Die Tidemark ist hier deutlich unterbrochen (Pfeil).

4.4. Ergebnisse des erweiterten O'Driscoll-Scores

Die histologische Auswertung der Präparate mithilfe des erweiterten O'Driscoll-Scores entspricht den bereits beschriebenen Ergebnissen des biomechanischen Testverfahrens. Die folgende Tabelle fasst die durchschnittlich erreichten Punktzahlen der Regenerate aller Versuchsgruppen im originären O'Driscoll-Score sowie in den Erweiterungen zusammen.

Modifizierter O'Driscoll-Score	L (120)	M (120)	M Ad.BMP-2 (120)	M (180)	M Ad.BMP-2 (180)
I. Vorherrschendes Gewebe	4,38	3,21	2,65	2,98	3,37
a.) Zellmorphologie	2,57	1,80	1,45	1,74	1,96
b.) Anfärbbarkeit der Matrix mit Saf-O	1,80	1,41	1,20	1,24	1,41
II. Strukturelle Eigenschaften	2,79	2,20	1,75	1,96	2,14
a.) Gleichmäßigkeit der Oberfläche	0,80	0,52	0,31	0,80	0,55
b.) Strukturelle Integrität	0,54	0,40	0,18	0,20	0,35
c.) Dicke	0,42	0,56	0,53	0,42	0,36
d.) Anbindung an angrenzenden Knorpel	1,04	0,72	0,73	0,53	0,87
III. Zeichen von Zellveränderungen oder Degeneration	2,38	2,30	2,04	1,59	2,04
a.) Hypozellularität	1,66	1,52	1,33	0,85	1,31
b.) Chondrozytencluster	0,71	0,78	0,71	0,74	0,73
IV. Degenerationszeichen im angrenzenden Knorpel	2,27	2,04	2,14	1,96	2,05
Gesamtpunkte (orig. O'Driscoll-Score)	11,80	9,74	8,57	8,48	9,60
Erweiterungen					
V. Anwesenheit von Kollagen I	1,35	0,98	0,88	0,88	1,06
VI. Anwesenheit von Kollagen II	2,13	1,60	1,47	1,70	1,74
Gesamtpunkte (Erweiterungen)	3,48	2,58	2,35	2,58	2,80
Gesamtpunktzahl (max. 30)	15,28	12,33	10,92	11,06	12,40

Tabelle 6: Erreichte durchschnittliche Punktzahlen im erweiterten O'Driscoll-Score (maximal mögliche Gesamtpunktzahl = 30).

Die höchste Punktzahl erzielte die Leerdefektgruppe (L (120)) mit durchschnittlich 15,28 (\pm 5,61 Standardabweichung) Punkten. Damit unterschied sie sich signifikant von den behandelten Versuchsgruppen M (120) und M Ad.BMP-2 (120) ($p < 0,001$). Die mit nativem Muskelgewebe behandelte Gruppe M (120) erreichte mit 12,33 (\pm 5,92) Punkten ein tendenziell, aber statistisch nicht signifikant, höheres Score-Ergebnis als

die gentherapierte Gruppe M Ad.BMP-2 (120) mit 10,92 (\pm 4,57) Punkten.

Die histologischen Score-Ergebnisse der einstigen Defekte nach der Standzeit von 180 Tagen zeigten dagegen ein anderes Bild: Die Therapie mit BMP-2-genaktivierten Muskelfaszientransplantaten führte nach 180 Tagen zu einem durchschnittlichen Score-Ergebnis von 12,40 (\pm 4,51) Punkten. Die rein muskelfaszienbehandelte Gruppe M (180) hingegen wurde mit 11,06 (\pm 4,70) Punkten im Mittel bewertet, und lag mit diesem Ergebnis tendenziell unter der gentherapierten Gruppe, was jedoch nicht statistisch belegt werden konnte ($p=0,92$).

Im Vergleich zur M Ad.BMP-2- Gruppe mit der kürzeren Standzeit von 120 Tagen erzielte die M Ad.BMP-2 (180)-Gruppe eine statistisch signifikant höhere Punktzahl ($p<0,05$). Die mit nativem Muskelfasziengewebe versorgte Gruppe M (180) erreichte eine, nicht statistisch verifizierbare, knapp niedrigere Punktzahl als die Vergleichsgruppe mit der kürzeren Standzeit von 120 Tagen ($p= 0,388$).

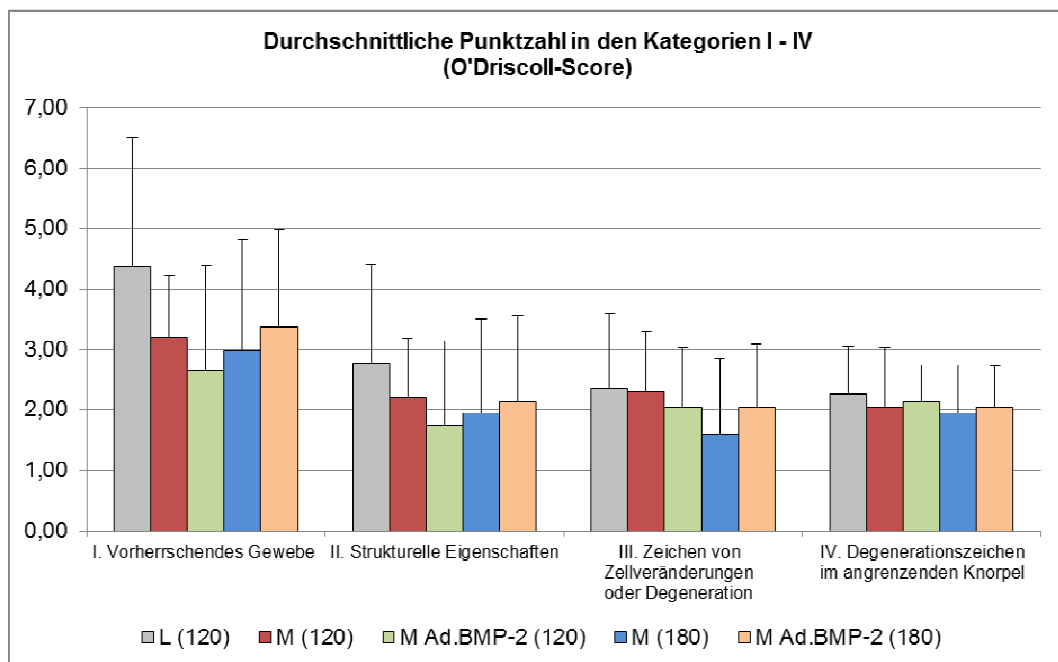


Abbildung 70: Durchschnittlich erreichte Punktzahlen in den Kategorien I – IV des O'Driscoll-Scores als Balkendiagramme mit Standardabweichungen.

Wie aus Abbildung 70 ersichtlich, erreichte die Leerdefektgruppe in jeder Kategorie die höchste Punktzahl.

In der ersten Kategorie „Vorherrschendes Gewebe“ waren maximal 7 Punkte zu vergeben. Die Leerdefektgruppe wurde mit 4,38 (\pm 2,14)

Punkten bewertet. Sowohl in der Zellmorphologie als auch in der Anfärbarkeit der Matrix mit Safranin-Orange ergaben sich für diese Gruppe die höchsten Punkte. Die zweithöchste Punktzahl erzielte hier die BMP-2-behandelte Gruppe M Ad.BMP-2 (180) mit $3,37 (\pm 1,62)$ Punkten, gefolgt von M (120) mit $3,21 (\pm 1,94)$ durchschnittlichen Punkten. Die niedrigsten Punktzahlen ergaben sich für M (180) mit $2,98 (\pm 1,84)$ und M Ad.BMP-2 (120) mit $2,65 (\pm 1,76)$ Punkten.

Die zweite Kategorie umfasst die „Strukturellen Eigenschaften“, in der maximal 9 Punkte möglich waren. L (120) erhielt mit $2,79 (\pm 1,63)$ Punkten die höchste Summe für diesen Abschnitt. Die nächsthöhere Punktzahl war $2,20 (\pm 1,96)$ für die Gruppe M (120), gefolgt von der gentherapierten Gruppe nach der Standzeit von 180 Tagen ($2,14 \pm 1,44$). Die niedrigsten Punktzahlen ergaben sich für M (180) ($1,96 \pm 1,55$) und M Ad.BMP-2 (120) ($1,75 \pm 1,40$).

Die geringsten „Anzeichen für Zellveränderungen und Degeneration“ hatten ebenfalls die Ersatzgewebe der unbehandelten Defekte ($2,38 \pm 1,23$) von maximal 5 zu erhaltenden Punkten. Die Präparate der Gruppen M (120) erzielte mit $2,30 (\pm 1,14)$ das zweithöchste Ergebnis. Die mit BMP-2-modifiziertem Muskelfasziengewebe versorgten Defekte erhielten dieselbe Punktzahl (M Ad.BMP-2 (120): $2,04 \pm 0,99$; M Ad.BMP-2 (180): $2,04 \pm 1,04$). M (180) wurde mit der niedrigsten Punktzahl bewertet ($1,59 \pm 1,26$).

In der vierten Kategorie „Degenerationszeichen im angrenzenden Knorpel“ konnten maximal 3 Punkte vergeben werden. Hier waren die Unterschiede zwischen den Gruppen kaum vorhanden: Die höchsten Punkte ergaben sich für L (120) ($2,27 \pm 0,77$) und für die mit BMP-2 behandelten Gruppen M Ad.BMP-2 (120) ($2,14 \pm 0,60$) und M Ad.BMP-2 (180) ($2,05 \pm 0,68$). Die geringsten Punkte erreichten die mit nativem Muskelfasziengewebe gefüllten Defekte: M (120) ($2,04 \pm 0,67$) und M (180) ($1,96 \pm 0,79$).

In den Erweiterungen des originalen O'Driscoll-Scores „Anwesenheit von Kollagen Typ I“ und „Anwesenheit von Kollagen Typ II“ erhielt die unbehandelte Leerdefektgruppe die höchste Gesamtsumme von $3,48 (\pm$

1,60) Punkten, wobei maximal 6 Punkte zu vergeben waren. Mit 2,80 (\pm 1,62) Punkten erreichte M Ad.BMP-2 (180) die zweithöchste Summe. Die mit nativen Muskelfaszien behandelten Gruppen M (120) und M (180) wurden mit jeweils 2,58 (SD M (120): \pm 1,39; SD M (180): \pm 1,51) Punkten bewertet. An Präparate der Gruppe M Ad.BMP-2 (120) wurden im Durchschnitt 2,35 (\pm 1,27) Punkte vergeben. Die folgende Abbildung zeigt nochmal die durchschnittlich erreichten Punktzahlen aller Versuchsgruppen in den Kategorien V und VI mit Standardabweichung.

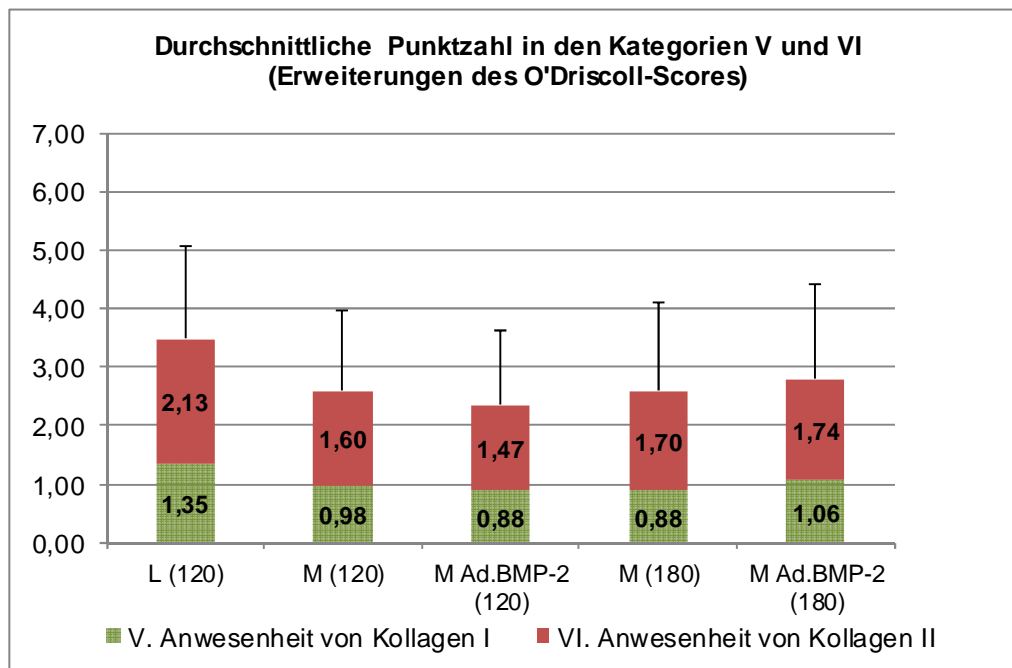


Abbildung 71: Gegenüberstellung der einzelnen Versuchsgruppen in Bezug auf das Vorhandensein von Kollagen Typ I und Kollagen Typ II. Die Leerdefektgruppe erhielt durchschnittlich die höchste Punktzahl sowohl in Kategorie V als auch VI. Die zweithöchste Punktzahl in beiden Kategorien erreichte M Ad.BMP-2 (180). Die dritthöchste Summe wurde an die muskelbehandelten Gruppen M (120) und M (180) vergeben, wobei die Gruppe mit der kürzeren Standzeit mehr Punkte in Kategorie V, dafür weniger Punkte in Kategorie VI erhielt als M (180). M Ad.BMP-2 (120) wurde mit der niedrigsten Gesamtpunktzahl versehen, erreichte aber in Kategorie V dieselbe Punktzahl wie M (180).

V. DISKUSSION

Die Behandlung von Gelenkknorpelläsionen stellt bis heute eine große Herausforderung in der klinischen Praxis dar. Aufgrund seiner Avaskularität besitzt Knorpelgewebe keine ausreichende Fähigkeit, sich selbst zu regenerieren. Gerade chondralen Defekten, die keinerlei Verbindung zum subchondralen Knochenmarkraum haben, fehlt die Möglichkeit zur Selbstheilung (BUCKWALTER, 1998). Aktuelle Therapiestrategien, z.B. in Form der Pridie-Bohrung, zielen darauf ab, das darunterliegende Knochenmark zu eröffnen. Es kommt zur Einblutung in den Defekt und schließlich zur Entstehung eines Fibringerinnsels mit einhergehender Gefäßeinsprossung und Einwanderung mesenchymaler Stammzellen sowie weiterer Heilungsfaktoren (INSALL, 1974; SHAPIRO et al., 1993b). Diese Stammzellen können sich zu Chondroblasten und schließlich zu Knorpelzellen differenzieren. Jedoch kommt es bei diesen Methoden lediglich zur Bildung eines Reparaturgewebes von minderer Qualität in Gestalt eines wenig belastbaren Faserknorpels mit einem hohen Kollagen Typ I Anteil. Eine Regeneration von hyalinen Gelenkknorpel findet nicht statt (MITCHELL & SHEPARD, 1976).

Erste klinische Ansätze aus dem Bereich des Tissue Engineering versuchen dieses Problem zu lösen. Mithilfe der Transplantation von Knorpelzellen (z.B. bei der MACT) werden *in vitro* gezüchtete Knorpelzellen eines Patienten in eine Trägersubstanz, z.B. Kollagenmembranen, eingebracht und in den Knorpeldefekt reimplantiert. Diese Methode kann eine kurz- bis mittelfristige Verbesserung der klinischen Symptome erreichen, jedoch wird auch hier nur maximal hyalinartiges Knorpelgewebe gebildet, welches nicht dieselbe physiologische Belastungsstabilität wie hyaliner Knorpel besitzt (BEHRENS et al., 2006). Weitere Nachteile dieser Verfahren sind die hohe Invasivität durch den doppelten Eingriff am Kniegelenk, die Schädigung gesunden Knorpels bei der Zellgewinnung und Kostenintensität durch mehrwöchige Kultivierung der Knorpelzellen unter GMP-Bedingungen.

Aufgrund der dargestellten Situation der Therapiemöglichkeiten von Knorpelläsionen werden neue experimentelle Ansätze aus dem Bereich des Tissue Engineering entwickelt, bei denen durch gezielte Kombination aus der Transplantation von Knorpel- oder mesenchymalen Stammzellen innerhalb einer Trägersubstanz unter Einwirkung knorpelstimulierender Wachstumsfaktoren und dem Einsatz von Gentransfermethoden, eine Wiederherstellung langfristig belastbaren Knorpelgewebes, im Idealfall von hyalinem Knorpel, gelingen soll (LANZA et al., 2011).

In dieser Studie wurde eine neuartige, weniger invasive und kostengünstigere, da intraoperative Methode aus dem Gebiet des Tissue Engineering untersucht, bei der die aufwendige Kultivierung und Isolierung von Zellen entfällt. Das Ziel war es, eine Regeneration von Knorpelgewebe in einem mit dem Menschen vergleichbaren Großtiermodell (Schaf) zu erreichen. Dazu wurde autologes, ovines Muskelgewebe mit anliegender Faszie einem adenoviralen Gentransfers unterzogen, um eine muskelzelleigene Expression und Produktion des Wachstumsfaktors BMP-2 zu generieren. Die so modifizierten Muskelgewebeproben wurden in je zwei chondralen Knorpeldefekten kritischer Größe im Bereich des medialen Femurkondylus des rechten Knies transplantiert.

1. Diskussion der Methoden

1.1. Tiermodell Schaf

In experimentellen Studien zur Knorpelforschung werden verschiedene Tiermodelle eingesetzt. Neben Schafen sind die häufigsten Versuchstiere für die Untersuchung der Knorpeldefektheilung Kaninchen (WAKITANI et al., 1994; HUNZIKER & ROSENBERG, 1996; ADACHI et al., 2002) sowie Hunde (CAMPBELL, 1969; VAN DYK et al., 1998; COOK et al., 2003), aber auch in selteneren Fällen Pferde (HIDAKA et al., 2003; FRISBIE et al., 2006b) und Ziegen (LOUWERSE et al., 2000; BREHM et al., 2006).

Für diese Studie wurden zwei bis drei Jahre alte, weibliche Merinolandschafe ausgewählt. Mit 24 Monaten ist die skelettale Entwicklung bei Schafen abgeschlossen, was für ein aussagekräftiges

Versuchsergebnis wichtig ist. Denn jüngere Tiere, die sich noch im Wachstum befinden, zeigen eine schnellere und bessere Heilungstendenz von Knorpeldefekten als erwachsene Tiere (WEI et al., 1997). Mit einem Durchschnittsgewicht von 66,7 kg besaßen die Versuchsschafe auch ein dem Menschen ähnlicheres Gewicht als beispielsweise Hunde. Eine höhere Vergleichbarkeit zwischen Schaf und Mensch finden sich auch in den Größenverhältnissen anatomischer Strukturen im Kniegelenk (AHERN et al., 2009; OSTERHOFF et al., 2010) und in der physiologischen Belastungssituation, da das Schaf eine geringere Flexionshaltung als Kaninchen aufweisen (BRUNS et al., 1992; ALLEN et al., 1998). Dennoch gibt es Einschränkungen in der Übertragbarkeit von Studienergebnissen auf den Menschen. Die Knorpeldicke unterscheidet sich in hohem Maße von der des Menschen (Knorpeldicke im Kniegelenk des Schafes: \varnothing 0,4 – 0,5 mm; Mensch: \varnothing 2,2 – 2,5 mm) (FRISBIE et al., 2006a). Für die Simulation chondraler Defekte des Menschen reicht somit beim Schafknorpel eine niedrigere Defekttiefe, um einen Volldefekt zu erzeugen (ca. 0,5 mm). Nicht nur der Unterschied zum Menschen, auch die hohe Variabilität in der Knorpeldicke innerhalb der Spezies Schaf ist ein Problem. FRISBIE et al. stellten bei sechs Schafen eine Bandbreite in den Knorpeldicken von 0,512 – 0,572 mm im proximalen Bereich und 0,579 – 0,639 mm im distalen Bereich des medialen Femurkondylus fest (FRISBIE et al., 2006a). Damit ist die Möglichkeit des Vergleichs von ovinen Knorpelstudien miteinander limitiert.

Ein großer Unterschied zwischen Untersuchungen am Tier und humanklinischen Studien besteht grundsätzlich in der Evaluation des Therapieerfolgs. Ein bedeutender Faktor für das Behandlungsergebnis beim Menschen ist die Schmerzreduktion. Dieser kann aber nur schwer im Tiermodell gemessen werden (BREINAN et al., 2001). Daher liegt der Fokus hier eher auf bildgebenden Verfahren wie der Magnetresonanztomographie *in vivo*, sowie auf biomechanischen oder histologischen Verfahren nach Euthanasie zur Beurteilung des Therapieerfolgs (FRISBIE et al., 2006b; AHERN et al., 2009; MUSCHLER et al., 2010).

Insgesamt stellt das Schaf trotz der genannten Limitationen ein wohl

akzeptiertes Tiermodell in der Knorpelforschung dar und wird häufig eingesetzt (DOROTKA et al., 2005b; HOEMANN et al., 2005; JUBEL et al., 2008; ERGGELET et al., 2009; IVKOVIC et al., 2011).

1.2. Adenoviraler Gentransfer und BMP-2

In diesem Versuch wurde die Transduktion von Zellen im Muskelgewebe mit anliegender Faszie mithilfe eines adenoviralen Vektors durchgeführt. In vielen präklinischen Studien hat sich diese Methode als erfolgreich erwiesen, um ein gewünschtes Transgen in Zellen zu integrieren (SMITH et al., 2000; CAO et al., 2004; IVKOVIC et al., 2011; MENENDEZ et al., 2011). Um die Funktionsfähigkeit des verwendeten Vektors zu prüfen, wurden ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assays) zur Messung der BMP-2-Konzentration in Zellkulturüberständen von transduzierten Muskelgewebestücken durchgeführt. Die Ergebnisse der ELISAs zeigten alle, dass das BMP-2-Gen innerhalb des viralen Episoms erfolgreich in zahlreiche Muskel- bzw. Faszienzellen übertragen wurde, was auf die Funktionsfähigkeit des Vektors in diesem System schließen lässt. Allerdings kann man die gemessene Höhe der BMP-2-Produktion unter *in vitro* Bedingungen nur bedingt auf die tatsächliche *in vivo* Expression übertragen, da das Muskeltransplantat im Kniegelenk den physiologischen Belastungen und anderen metabolischen Vorgängen des Kniegelenks ausgesetzt ist (z.B. Verlust des Transplantats, Entzündungsreaktionen, Mangelernährung, unzureichende Sauerstoffversorgung). Eine quantitative Messung der BMP-2-Expression *in vivo* ist mit gegenwärtigen Methoden nicht möglich.

In der Knorpelforschung sind neben BMP-2 TGF- β 1 und BMP-7 (auch bekannt als *osteogenic protein 1 (OP-1)*), die meist untersuchten Wachstumsfaktoren, sowie IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) (FORTIER et al., 2011). Für diesen Versuch wurde BMP-2 als knorpelstimulierendes Zytokin ausgewählt. Als Teil der TGF- β -Superfamilie wirkt BMP-2 *in vitro* stimulierend auf Chondrozyten und auf mesenchymale Stammzellen. Es regt die Synthese von Proteoglykanen und Kollagen Typ II an und reguliert die Expression des Kollagen Typ I-Gens herunter (SAILOR et al., 1996). Zudem induziert BMP-2 *in vitro* die Differenzierung adulter mesenchymaler Stammzellen hin zum chondrogenen Zelltyp (SCHMITT et al., 2003). Auch

in vivo fand sich die positive Wirkung von BMP-2 bei der Heilung von Knorpeldefekten wieder. Eine Studie zur Untersuchung partieller chondraler Defekte im Schwein wies auf eine höhere Chondrozytendichte im neu entstandenen Gewebe im Vergleich zu TGF- β 1 hin (HUNZIKER et al., 2001). Außerdem besteht bei Einsatz von TGF- β 1 nachweislich das Risiko unerwünschter Nebeneffekte, wie Osteophytenformationen, Pannusbildung oder inflammatorische Synovitis (BAKKER et al., 2001; BLANEY DAVIDSON et al., 2007). In Volldefekten an der femoralen Trochlea im Kaninchen, die mit BMP-2 versorgt wurden, entstand hyalinartiges Knorpelgewebe von tendenziell höherer Qualität als in Defekten, die nur mit Chondrozyten behandelt wurden (FRENKEL et al., 2000).

Auch BMP-7/OP-1 erwies sich *in vitro* und in tierexperimentellen Studien bereits als erfolgversprechendes Agens in der Knorpelforschung. Anders als die restlichen TGF- β -Wachstumsfaktoren besitzt es nicht nur pro-anabolische Wirkweisen (z.B. erhöhte Produktion der EZM), es hat auch ausgesprochen starke anti-katabolische Effekte: Es hemmt zahlreiche katabol wirkende Zytokine wie Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8) und Matrixmetalloproteinasen (ELSHAIR et al., 2009). In Kombination mit IGF-1 zeigt es synergistische Wirkung und erhöht so das Heilungspotential (LOESER et al., 2003; FAN et al., 2004). In einer Schafstudie konnte eine partielle Füllung fokaler chondraler Defekte mit neuem hyalinartigem Knorpelgewebe erreicht werden, indem OP-1 über zwei Wochen durch eine subkutan implantierte mini-osmotische Pumpe als flüssige Lösung ins Kniegelenk appliziert wurde. Kontrolldefekte blieben dagegen ungefüllt (JELIC et al., 2001)

BMP-7 ist somit neben BMP-2 ein potenter Wirkstoff, um eine Heilung von Knorpeldefekten zu begünstigen und damit ein potentieller Wachstumsfaktor für eine Folgestudie.

Von Interesse innerhalb dieses Studiendesigns wäre daher auch ein Vergleich von BMP-2 mit BMP-7 oder die Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. BMP-7 oder IGF-1). Folgeuntersuchungen auf diesem Gebiet wären folglich erstrebenswert.

1.3. OP-Technik und Beobachtungszeitraum

Für die Freilegung des medialen Femurkondylus wurde ein parapatellarer Zugang am rechten Kniegelenk gewählt. Unter Flexion des Kniegelenkes wurden zwei übereinander liegende, 8 mm im Durchmesser betragende und ca. 1 mm tiefe, chondrale Knorpelvolldefekte im lasttragenden Bereich der medialen Femurkondyle unter Einsatz einer Hautbiopsiestanze und einer Kürette geschaffen. Mit 8 mm wurde eine Defektgröße kritischen Ausmaßes gewährleistet, wodurch eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Spontanheilung, wie sie bei geringfügigen Knorpelläsionen stattfinden kann, ausgeschlossen wurde (CONVERY et al., 1972; BRUNS et al., 1997). Im Durchschnitt liegt der Durchmesser von kritischen Knorpeldefekten an der medialen Femurkondyle in Schafmodellen bei 7,4 mm (AHERN et al., 2009). Dies entspricht am ehesten den realen klinischen Gegebenheiten bei humanen, chondralen Knorpelvolldefekten (MESSNER & MALETIUS, 1996; SGAGLIONE et al., 2002; SCHINHAN et al., 2012). Aufgrund der physiologisch geringeren Knorpeldicke bei Schafen im Vergleich zum Menschen, ergibt sich dennoch zwangsläufig in chondralen Knorpelvolldefektmodellen im Schaf insgesamt ein vielfach kleineres Knorpeldefektvolumen (ca. 40 mm³ Defektvolumen) als bei humanen Knorpeltraumata oder Arthrosen (ca. 420 mm³ Defektvolumen) (AHERN et al., 2009). Dennoch stellt die gewählte Defektgröße von 8 mm im Tiermodell Schaf ein allgemein akzeptiertes und geeignetes Studienmodell in der orthopädischen Knorpelforschung dar (MARTINI et al., 2001; BUMA et al., 2004; KANDEL et al., 2006; KLEEMANN et al., 2007; JUBEL et al., 2008; ERGGELET et al., 2009; SCHINHAN et al., 2012).

Das Einnähen der Muskelgewebestücke mit Faszie mithilfe eines resorbierbaren Fadens gestaltete sich aufgrund des beengten Raumes und der dauerhaften, manuellen Flexion des Kniegelenkes als sehr schwierig. Die Alternative für eine Fixation der Gewebestücke war der Einsatz von Fibrinkleber. Auf diesen wurde aber bewusst verzichtet, da Fibrinkleber Fremdkörperreaktionen hervorrufen kann (SANAL, 1993). Die mögliche Folge wäre eine Entzündungsreaktion und eine zu schnelle Resorption der BMP-2 liefernden Muskelgewebestücke. Da die Tiere

direkt nach der Operation die rechte Hintergliedmaße voll belasten durften und die Aufstehversuche teilweise mit unkontrollierten Bewegungen verbunden waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Muskeltransplantate durch die starke Belastung des Gelenkes post operationem ausrissen (*loss of transplant*). Vermeidbar wäre dies nur durch eine massive Einschränkung der Beweglichkeit der Tiere mittels Gipsverband. Dadurch verhindert man aber eine moderate Bewegung des Gelenks, die für eine optimale nutritive Versorgung des Knorpels und die Anregung der Knorpelheilung aber von Vorteil ist (PARK et al., 2004). Zudem schonten die Tiere in den meisten Fällen direkt nach der Operation die rechte Hintergliedmaße leicht und belasteten diese nur vorsichtig.

Die Beobachtungszeiträume betrugen in dieser Studie 16 bzw. 24 Wochen. Auch in anderen Studien im Schafmodell wurden Standzeiten nach der Operation von 12 bzw. 24 Wochen gewählt (JELIC et al., 2001; SIEBERT et al., 2003; KLEEMANN et al., 2007; SEEDHOM et al., 2007; SCHLICHTING et al., 2008). Damit ist eine relativ gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Studienergebnisse gegeben, was die Dauer der Heilungsphase angeht. Allerdings sind für die Evaluation des klinischen Erfolgs bei der Therapie von Knorpeldefekten am Menschen eher mittel- bis langfristige Ergebnisse nach mehreren Jahren interessant (AUBIN et al., 2001; BIAANT et al., 2014). Diese Studie lässt hinsichtlich des Langzeiterfolges der angewendeten Methode keine Aussage zu. Für weitere Untersuchungen wäre daher ein längerer Beobachtungszeitraum von mehr als einem Jahr eine sinnvolle Ergänzung zu dieser Studie.

1.4. Indentationstest

Der Indentationstest (Be- und Entlastungsmessung) ist das am häufigsten verwendete Instrument, um die biomechanischen Eigenschaften von Knorpelgewebe zu analysieren und messbar zu machen (LINN & SOKOLOFF, 1965; MOW et al., 1989; APPLEBY et al., 2001). Zugrunde liegt dieser Messmethode die biphasische Theorie zum viskoelastischen Verhalten von Knorpel, die von Mow et al. entwickelt wurden (MOW et al., 1980). Danach besteht Knorpelgewebe aus einer festen (EZM) und einer flüssigen Phase. Bei Belastung strömt die Flüssigkeit aus der porösen festen Phase heraus, die sich unter der auf

sie wirkenden Kraft deformiert.

Daher wurde in dieser Studie ein Indentationstest an den distalen Defektproben durchgeführt, um die Steifigkeit, d.h. den Widerstand des neu gebildeten bzw. nativen Knorpelgewebes gegen seine Deformation, zu messen. Dabei waren die zylindrischen Proben freistehend (*unconfined*), da die Knorpelzylinder den sie umfassenden Metallzylinder stets überragten – ein wichtiges Kriterium, da es dem Gewebe dadurch möglich war, der Druckbelastung frei nach außen auszuweichen. Dies entspricht auch eher den physiologischen Gegebenheiten *in vivo* (HURSCHLER & ABEDIAN, 2013).

Ein weiterer Vorteil dieses Testverfahrens besteht darin, dass die biomechanischen Eigenschaften der Knorpelproben inklusive des darunterliegenden Knochens *in situ* gemessen werden können. So liegt bei Messung eine Situation vor, die den realen, physiologischen Bedingungen entspricht (LU & MOW, 2008).

Innerhalb dieser Studie ergaben sich so aussagekräftige Steifigkeitswerte für Kontroll- und Versuchsgruppen. Jedoch ist ein studienübergreifender Vergleich mit anderen experimentellen Tiermodellen nur begrenzt durchführbar, da sich die Testregimen hinsichtlich verschiedener Faktoren wie Durchmesser des Indentors, Form des Indentors oder Probendesign, stets leicht unterscheiden (JURVELIN et al., 1990; DATTENA et al., 2009; MARQUASS et al., 2010; IVKOVIC et al., 2011). Damit sind die absoluten Steifigkeitswerte nicht studienübergreifend miteinander vergleichbar.

Eine Limitation der Studie ist die Gestaltung der Testdurchführung bei den Versuchsgruppen L, M, M Ad.BMP-2 mit der Standzeit von 120 Tagen, da hier die makroskopische Beurteilung maßgeblich für den Ort der Messung war. Da dies natürlich nach subjektivem Ermessen geschah, hätten abhängig vom Betrachter eventuell leicht unterschiedliche Messergebnisse zustande kommen können.

1.5. Modifizierter O'Driscoll-Score

Zur histologischen Auswertung des neu gebildeten Gewebes im Defektbereich kam ein erweiterter O'Driscoll-Score zur Anwendung. Das klassische Bewertungsschema nach O'Driscoll ist bei der Evaluation von

Knorpelregeneraten eine gut etablierte und validierte Methode (ORTH et al., 2012). So beschreibt der Score bis zu neun verschiedene Parameter und macht ihn somit zu einem komplexeren und deskriptiv ausführlicheren Score als beispielsweise die relativ einfachen Bewertungsschemata von Pineda et al. (PINEDA et al., 1992) oder Wakitani et al. (WAKITANI et al., 1994). Besonders im Fokus steht die Natur des Reparaturgewebes, hier vor allem die strukturelle Integrität und zellulären Eigenschaften, sowie Anzeichen von degenerativen Prozessen (O'DRISCOLL et al., 1986; ORTH et al., 2012).

Ein Nachteil dieses Scoringssystems liegt allerdings darin, dass dieses Schema keine definierte Schnittebene vorsieht, in der das Präparat bewertet werden soll. Dieses Problem kommt daher vor allem bei inhomogenen Regeneraten mit starker Inselbildung zu tragen, da die Beurteilung stark davon abhängt, in welcher Ebene die Probe betrachtet wird. Daher wurden in dieser Studie drei Schnittebenen zur Bewertung herangezogen (im Zentrum und jeweils 1,5 mm davon entfernt), um eine möglichst objektive und für den Defekt gültige Wertung der Defektheilung zu erhalten.

Zudem wurde der Score um die immunhistochemischen Färbungen Kollagen Typ I und Kollagen Typ II erweitert, um die Qualität des neu entstandenen Gewebes besser eruieren zu können, selbst wenn es sich um Gewebeinseln handelte und die strukturelle Integrität in diesen Fällen kaum gegeben war.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1. ELISA-Messungen

Die Funktionsfähigkeit des Vektors konnte bei allen drei ELISAs nachgewiesen werden. Es waren BMP-2-Konzentrationen von minimal 7,57 ng/ml an Tag 3 bis maximal 1939 ng/ml an Tag 20 in den Zellkulturüberständen messbar.

ELISA 1 zeigte darüber hinaus, dass Muskelstücke mit anliegender Faszie eine höhere Produktion von BMP-2 lieferte, als Muskelgewebstücke ohne Faszie. In der Literatur existieren zahlreiche Studien, bei denen bislang

viele Zellarten aus unterschiedlichen Gewebequellen einem Gentransfer unterzogen worden sind (Fett-, Muskel-, Knorpel-, Sehngewebe, Knochenmarkszellen, isolierte adulte, mesenchymale Stammzellen etc.).

Vermutlich sind die an Oberfläche der Gewebeprobe liegenden Fibrozyten/Fibroblasten der Faszien für den adenoviralen Vektor zugänglicher und zahlreicher als die Muskelzellen.

Der zweite ELISA zeigte eine kontinuierlich hohe BMP-2-Produktion der transduzierten Muskelstücke über einen Zeitraum von 33 Tagen. Die Halbwertszeit von in der klinischen Praxis verwendetem rhBMP-2 beträgt hingegen ca. sieben bis sechzehn Minuten (KATANEC et al., 2014). Damit konnte innerhalb dieser Untersuchung gezeigt werden, dass durch adenoviralen Gentransfer von Muskelzellen und Kultivierung der Zellen eine längerfristige BMP-2-Produktion *in vitro* aufrechterhalten werden kann, als es bei einmaliger Applikation von rhBMP-2 der Fall ist.

Wie hoch die Dosierung von BMP-2 gewählt werden muss, um eine hinreichende Stimulation zur Knorpelregeneration zu gewährleisten, ist bisweilen unklar. Die Arbeitsgruppe um Rani S. Sellers verwendete zur Therapie von Trochlea-Volldefekten im Kaninchen einen Kollagenschwamm, der mit 5,0 µg iodiertem BMP-2 imprägniert war. Das enthaltene rhBMP-2 war *in vivo* nicht länger als 14 Tage über die Detektion der Gammastrahlen nachweisbar. Trotz der kurzen Halbwertszeit von 5,6 Tagen im Kollagenschwamm war nach einem Jahr Beobachtungszeit bei der mit BMP-2 behandelten Gruppe eine bessere Knorpelheilung festzustellen, als im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei sich das neue Füllgewebe von normalem Knorpel stark unterschied (SELLERS et al., 2000).

Die BMP-2-Konzentrationen aus den drei ELISAs lagen im Bereich von ca. 0,007 µg/ml bis 1,7 µg/ml. Da diese BMP-2 Konzentrationen über einen längeren Zeitraum von bis zu 33 Tagen nachgewiesen werden konnten, kann die Höhe von BMP-2 in dieser Studie als ausreichend betrachtet werden, wenn auch mit den Limitationen, dass keine vergleichbaren Daten in der Literatur zur Verfügung stehen und die Testergebnisse das Resultat von *in vitro* Versuchen sind und so nur unter

Vorbehalt auf die *in vivo* Situation übertragen werden können.

Zum Vergleich: Für den Einsatz von rhBMP-2 zur Versorgung von humanen Knochenfrakturen (Tibia, Lendenwirbel) wird die Dosierung 0,75 bis 1,5 µg/ml rhBMP-2 verwendet (GOVENDER et al., 2002).

2.2. Biomechanik

Über alle Kontroll- und Versuchsgruppen hinweg kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Steifigkeit von Zyklus 1 bis 5. Am deutlichsten war diese Zunahme von Zyklus 1 zu 2, ab Zyklus 2 wurde allmählich ein stationärer Zustand erreicht (s. Tabelle 3). Zu erklären ist dieses Phänomen durch die Verschiebung im viskoelastischen Gleichgewicht des Knorpels: Nach der initialen Belastung in Zyklus 1 wird Wasser aus dem Gewebe herausgepresst, bei Entlastung strömt wieder zu einem gewissen Anteil Wasser zurück in das Gewebe, aber nicht im selben Maße wie es im Ursprungszustand der Fall war. Die weiteren Belastungen von Zyklus 2 bis 5 lassen daher eher Rückschlüsse auf die spezifischen Eigenschaften des festen Anteils des Knorpelgewebes, das heißt der extrazellulären Matrix mit Proteoglykanen und Kollagenen, zu. Die zeitveränderliche Komponente, das Wasser ist somit nicht berücksichtigt und der Einfluss der stationären Phase, der EZM, wird durch die Messung deutlich. Dies lässt Interpretationen hinsichtlich der Qualität (Anteil an Proteoglykanen, Kollagenen, etc.) des gemessenen Gewebes zu (KEMPSON et al., 1970; MOW et al., 1984; BAE et al., 2003). Daher wurde der fünfte Zyklus auch zur statistischen Auswertung herangezogen, da hier ein stabiler Zustand erreicht war.

Steifigkeitsergebnisse der Testung nach makroskopischer Beurteilung

In dieser Studie betrug die Steifigkeit von gesundem ovinen Knorpel im Mittel (KL (120): $26,97 \pm 7,76$ N/mm bzw. KL (180) $26,92 \pm 3,26$ N/mm). Alle Versuchsgruppen erreichten Steifigkeitswerte in Zyklus 5, die signifikant über den Werten des nativen Knorpelgewebes lagen. Somit ergab sich für diese Gruppen ein biomechanisch schlechteres Ergebnis im Vergleich zu gesundem Knorpelgewebe. Dem gesunden Knorpel am nächsten kam noch die unbehandelte Versuchsgruppe L (120) ($39,63 \pm 10,08$ N/mm). Die höchsten Werte ergaben sich für die Gruppen L (120)

leer, M (120) leer und M Ad.BMP-2 (120) leer, d.h. auf den ungefüllten Stellen im Defektbereich. Die Steifigkeiten der Regenerate, d.h. an Stellen, an denen makroskopisch Gewebeneubildung erfolgte, waren für die unbehandelte Gruppe L (120) Gewebe am niedrigsten, gefolgt von der rein muskelbehandelten Versuchsgruppe und der Gruppe mit BMP-2 genmodifiziertem Gewebe. Zwischen allen Versuchsgruppen untereinander ergab sich aber statistisch kein signifikanter Unterschied in der Steifigkeit. Auch für die Standzeit von 180 Tagen ergab sich ein ähnliches Bild: Die mit BMP-2 behandelten Versuchsgruppen M Ad.BMP-2 (180) Gewebe und M Ad.BMP-2 (180) leer zeigten deutlich höhere Steifigkeitswerte als gesunde Vergleichsproben, wobei keine Differenz zwischen diesen Gruppen in Zyklus 5 zu messen war.

Auch die unterschiedliche Standzeit hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Heilungstendenzen der chondralen Defekte, wenn auch tendenziell niedrigere Steifigkeitswerte nach der längeren Standzeit festzustellen waren. Möglicherweise wäre der Unterschied noch größer gewesen, wenn eine zusätzliche Messung nach einem Jahr erfolgt wäre, da so eine längere Heilungsphase gegeben gewesen wäre.

Steifigkeitsergebnisse der Fünf-Punkt-Messung

Die Steifigkeitswerte im fünften Zyklus der Versuchsgruppen M (180) ($44,88 \text{ N/mm} \pm 10,55 \text{ N/mm}$) und M Ad.BMP-2 (180) ($48,03 \text{ N/mm} \pm 9,19 \text{ N/mm}$) waren höchst signifikant über denen der Kontrollgruppe KL ($27,40 \text{ N/mm} \pm 8,96 \text{ N/mm}$). Tendenziell ergaben sich bessere Werte für die rein muskelbehandelten Defekte als für die BMP-2 therapierte Gruppe. Somit lässt sich auch hier keine bessere Heilungstendenz von chondralen Defekten nach Pridie Bohrung durch den Einsatz von BMP-2 genaktiviertem Muskelfasziengewebe im Vergleich zu nativen Muskeltransplantaten feststellen.

Gesamtbetrachtung

Die stets höheren Steifigkeitswerte über die Versuchsgruppen hinweg lassen darauf schließen, dass das neu gebildete Gewebe sich stark in den biomechanischen Charakteristika von gesundem hyalinem Knorpel unterschied und nicht die typischen viskoelastischen Eigenschaften

gesunden Gelenkknorpels aufwies. Die Verschiebung von flüssiger zu fester Phase konnte hier nicht in dem Maße erfolgen, wie es bei hyalinem Knorpel der Fall wäre aufgrund einer anderen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (geringerer Anteil an Proteoglykanen und Kollagen Typ II) oder Fehlen jeglichen Knorpelgewebes. Wahrscheinlich handelte es sich bei den Gewebeinseln um minderwertigen Faserknorpel oder Bindegewebe, welche während der Belastung stark nachgaben und letztlich eher der Widerstand des subchondralen Knochens im Indentationstest gemessen wurde. Dieser ist naturgemäß deutlich größer als der von gesundem Knorpelgewebe.

Hinsichtlich der Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen kann festgehalten werden, dass kein biomechanisch bedeutsamer Unterschied in den Eigenschaften des Reparaturgewebes existierte, unabhängig davon, ob die geschaffenen chondralen Defekte durch Transplantation von unbehandelten oder BMP-2 genaktivierten Muskelgewebestücke versorgt wurden. Die besten biomechanischen Ergebnisse lieferten die leeren Kontrolldefekte, bei denen es anscheinend zu einer verbesserten Defektfüllung kam, was sich auch bei der makroskopischen Betrachtung feststellen ließ. Das BMP-2 hatte offensichtlich keinen Einfluss auf eine quantitativ als auch qualitativ bessere Defektfüllung.

Ein Grund hierfür könnte von methodischer Natur sein, da durch die sofortige Verschließung des frischen Defektgebietes mit einem autologen Muskelgraft, ob unbehandelt oder genaktiviert, der Einstrom von Blut und Knochenmarkszellen nach Pridie Bohrung erschwert wird. Dadurch könnte es in diesem Falle zum einen nicht zu den physiologischen Heilungsmechanismen kommen, zum anderen gelangen dadurch nicht ausreichend mesenchymale Stammzellen in das Defektgebiet, die durch das BMP-2 zur Differenzierung in den chondrogenen Zelltyp angeregt werden. Somit ließe sich auch der nicht signifikante Unterschied zwischen nativem und genaktiviertem Muskelfasziengewebe bezüglich der biomechanischen Resultate erklären.

Weiterhin könnte es zu Irritationen im Gelenk durch unvollständig losgerissene Muskeltransplantate gekommen sein oder die Gewebestücke gingen gänzlich verloren. Beides kann nicht ausgeschlossen werden, da

die Tiere direkt nach der Operation die Hintergliedmaßen vollständig belasten durften und teilweise unkontrolliert heftige Bewegungen beim Aufstehversuch zeigten.

Eine weitere Studie am Schaf lieferte ähnliche Resultate bezüglich der Steifigkeit von Regeneratgewebe. Ivkovic et al. konnten zeigen, dass nach Versorgung von chondralen Defekten mit TGF- β 1 genaktiviertem autologen Knochenmarksaspiraten die Steifigkeitswerte des neuen Gewebes hoch signifikant über den Steifigkeitswerten von gesundem Knorpelgewebe lagen. Im Vergleich zu reinem Knochenmarksaspirat lag kein signifikanter Unterschied vor, im Nanometerbereich schnitt die TGF- β 1 Gruppe sogar bedeutend schlechter als die Kontrollgruppe mit reinem Knochenmarksaspirat ab (IVKOVIC et al., 2011).

Dass die biomechanischen Eigenschaften von Regeneratgewebe im Vergleich zu Mikrofrakturierung alleine verbessert werden kann, zeigten Milano et al.. Allerdings kam hier keine Gentherapie zur Behandlung von chondralen Knorpeldefekten im Schaf zum Einsatz, sondern eine Versorgung mit plättchenreichem Plasma. Die Steifigkeit von nativem Knorpelgewebe wurde aber auch hier nicht erreicht (MILANO et al., 2010).

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass durch den Einsatz der beschriebenen Methode des Tissue Engineering keine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften des Regeneratgewebes bei chondralen Defekten im Vergleich zu alleiniger Pridie-Bohrung erzielt werden konnte.

2.3. Diskussion der makroskopischen und histologischen Ergebnisse

In dieser Studie konnte durch den Einsatz von BMP-2-genmodifizierten Muskeltransplantaten keine makroskopisch und histologisch erkennbare Verbesserung der Knorpelregeneration gegenüber der konventionellen subchondralen Pridie-Bohrung erzielt werden. Bei keiner der Versuchsgruppen ist eine Regeneration von physiologischem, hyalinem Knorpel erfolgt.

Die Kontrollgruppe L erreichte im O'Driscoll-Score und in den Erweiterungskriterien die höchsten Punktzahlen und hob sich mit $11,80 \pm$

4,51 bzw. $3,48 \pm 1,60$ Punkten als einzige Gruppe sogar signifikant von den anderen Versuchsgruppen ab. Sie war auch in allen Subkategorien überlegen. So wies das Reparaturgewebe der L-Gruppe die stärkste Safran-Orange/Lichtgrün-Anfärbbarkeit und eine dem hyalinen Knorpel ähnlichste Zellmorphologie auf. Das Ersatzgewebe erreichte hier die beste Anbindung an den gesunden Knorpel und strukturelle Beschaffenheit. Die Anteile von Kollagen Typ II und Kollagen Typ I waren höher bzw. niedriger als in den Therapiegruppen. Die Mehrzahl der Defekte der L-Gruppe ließ makroskopisch eine Inselbildung mit neuem, knorpelartigem Gewebe im Bereich der ehemaligen Bohrlöcher erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass durch das Einströmen von Blut infolge der Eröffnung des subchondralen Knochenraumes der erwünschte Effekt dieser Methode, nämlich das Einwandern von Stammzellen und Differenzierung zu Chondrozyten stattfand. Zudem war zumeist ein Einwachsen von neuem hyalinartigem Knorpelgewebe vom Rand des Defektes her sichtbar. Somit lässt das Ergebnis der makroskopischen bzw. histologischen Betrachtung und des semiquantitativen Scores darauf schließen, dass hier ein knorpelähnliches Reparaturgewebe entstanden ist mit teilweise hyalinknorpeligen Eigenschaften.

Vergleichbare Resultate finden sich auch in der Literatur. So haben Dorotka et al. sehr ähnliche Ergebnisse nach Versorgung chondraler Knorpeldefekte im Schaf mittels Mikrofrakturierung erzielt (DOROTKA et al., 2005a). Typischerweise entstand auch hier ein Reparaturgewebe innerhalb der erzeugten Löcher nach Mikrofrakturierung. Das Ergebnis des O'Driscoll-Scores lag für die MF-behandelten Defekte bei $10,6 \pm 1,6$ Punkten nach einer identischen Standzeit von vier Monaten. Nach zwölf Monaten wurde nur noch ein Score-Ergebnis von $6,5 \pm 0,9$ Punkten erzielt, was auf eine Degeneration des neuen Reparaturgewebes im Laufe der Zeit schließen lässt und so die bekannte Problematik der minderwertigen und nicht dauerhaften Ersatzknorpelbildung nach knochenmarksstimulierenden Interventionen zum Tragen kommt.

Die muskelbehandelten Gruppen ohne Einsatz gentherapeutischer Strategien (M (120) und M (180)) wiesen ebenfalls die charakteristische Inselbildung in den Defektgebieten innerhalb der Bohrlöcher auf. Es waren

aber zudem auch flächenhafte, weiß erscheinende Defektfüllungen sowie ungefüllte Defekte vorhanden. Die histologische Auswertung der Füllgewebe ließ auf eine Neubildung von Faserknorpel schließen aufgrund der geringen Anfärbbarkeit mit Safranin-Orange und dem hohen Anteil an Kollagen Typ I. Mit einem Score-Gesamtergebnis von $12,33 \pm 5,92$ Punkten lag die Gruppe mit der kürzeren Standzeit geringfügig über den Werten der muskelbehandelten Gruppe mit 180 Tagen ($11,06 \pm 4,70$). Da auch hier hohe Standardabweichungen zu verzeichnen waren, kann keine eindeutige Aussage zum Einfluss der unterschiedlichen Standzeiten auf die Defektfüllung getroffen werden. Möglicherweise stellt der geringfügig niedrigere Score der Gruppe M (180) einen ersten Hinweis auf progressive, degenerative Prozesse dar. Im Vergleich zur Leerdefektgruppe erreichten beide Muskelgruppen einen signifikant geringeren Score. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die oftmals fehlende Defektfüllung bei M (120) und M (180). Der Grund für die schlechtere Gewebeneubildung könnte wie bereits genannt durch die Verschließung der gebohrten Zugänge zum Knochenmark durch das Muskelimplantat selbst sein. Das Einwandern von Blut und Knochenmarkszellen könnte dadurch erschwert worden sein und es kam nicht zu den physiologischen Heilungsmechanismen wie es bei der Kontrollgruppe L der Fall war. Denkbar wären auch Irritationserscheinungen im Gelenk durch hervortretende Nähte oder das Loslösen der Muskelstücke als Ursachen der schlechteren Defektfüllung.

Die BMP-2-therapierten chondralen Defekte unterschieden sich von denen der Vergleichsgruppen makroskopisch wiederum in geringem Maße. Die Inselbildung im Bereich der Bohrlöcher war auch hier bei M Ad.BMP-2 (120) und M Ad.BMP-2 (180) stark ausgeprägt, wobei die Gruppe mit der längeren Standzeit teilweise größere Gewebeinseln hervorbrachten. Bei vielen Defekten kam es unter dem Einfluss von BMP-2 regelrecht zu einer netzartigen Verbindung der weißlich-durchsichtigen Gewebeinseln. Im histologischen Bild waren hyaline Knorpelanteile in den Inseln mit stark rot gefärbter Matrix, einer hohen Dichte an Chondrozyten und hohem Kollagen Typ II-Anteil bei den BMP-2 Gruppen beider Standzeiten zu sehen. Daneben gab es aber auch Stellen mit einer dünnen Schicht

Bindegewebe oder Bereiche mit minderwertigem Faserknorpel. In der Gruppe M Ad.BMP-2 (180) waren auch flächig gefüllte Defekte vorhanden mit einer dünnen Schicht hyalinen Knorpelgewebes, das eine hohe Dichte an Chondrozyten, teilweise in großen Clustern organisiert, aufwies. Diese Füllgewebe enthielten einen hohen Anteil an Kollagen Typ II und an Proteoglykanen. Diese Beobachtungen spiegeln sich auch im modifizierten O'Driscoll-Score wider. Mit $12,40 \pm 4,51$ Punkten erreichte die BMP-2 Gruppe mit der Standzeit von 180 Tagen (M Ad.BMP-2 (180)) ein tendenziell besseres Resultat als die muskelbehandelte Gruppe ohne Gentransfer (M (180)) mit $11,06 \pm 4,70$ Punkten. M Ad.BMP-2 (180) war der M (180)-Gruppe in allen Subkategorien überlegen. Damit ließ sich ein geringfügiger positiver Einfluss von BMP-2 auf die Knorpelregeneration vermuten, wenngleich dieser nicht statistisch signifikant war. Noch deutlicher war allerdings die Differenz zur BMP-2-Gruppe mit der kürzeren Standzeit von 120 Tagen. M Ad.BMP-2 (180) erzielte im Vergleich zu M Ad.BMP-2 (120) eine statistisch signifikant höheres Ergebnis im Score ($12,40 \pm 4,51$ vs. $10,92 \pm 4,57$ Punkte). Ausschlaggebend für die höhere Punktzahl waren das häufigere Vorkommen hyalinartigen Gewebes und die bessere strukturelle Beschaffenheit des Füllgewebes (hyalinähnlichere Zellmorphologie, gleichmäßigere Oberfläche, verstärkte Anbindung an den angrenzenden Knorpel, verbesserte strukturelle Integrität). Das bessere histologische Ergebnis deckte sich somit weitgehend mit der Evaluierung der vorherigen makroskopischen Betrachtung. Ursache der überlegeneren Defektfüllung nach längerer Standzeit könnte in der anhaltenden stimulierenden Wirkung des BMP-2 auf die Knorpelproliferation liegen oder einfach in der zusätzlich verfügbaren Regenerationszeit. Eine positive Auswirkung längerer Standzeiten auf die Knorpelregeneration bestätigte sich auch in dem bereits erwähnten Versuch von Sellers et al. zur Regeneration von osteochondralen Defekten in der Trochlea von Kaninchen. Das histologische Ergebnis der Defekte, die mit einem rhBMP-2-getränkten Kollagenschwamm behandelt wurden, war zu den ausgewählten Zeitpunkten (4, 8 und 24 Wochen) dem jeweils vorherigen Ergebnis überlegen (SELLERS et al., 1997). Eine verhältnismäßig gute Knorpelheilung im Vergleich zu unbehandelten Leerdefekten war selbst nach einem Jahr noch zu beobachten, was eine Verbesserung in der

Integration, Zellmorphologie, Architektur des Defektes und Neubildung einer Tidemark beinhaltete. Die Studie belegte zudem die positive chondrogene Wirkung von rhBMP-2 auf die Knorpelheilung, da hier die histologischen Ergebnisse den Resultaten nach Implantation von nativen Kollagenschwämmen ohne rhBMP-2 in die Defekte stark überlegen waren. Dennoch unterschied sich das Ersatzgewebe immer noch sehr von normalem hyalinem Knorpel.

Ein komplett anderes Bild ergab sich bei dem Vergleich der BMP-2-Gruppe mit der muskelbehandelten Gruppe zum Zeitpunkt von 120 Tagen. ($10,92 \pm 4,57$ vs. $12,33 \pm 5,92$). Im Gegensatz zur Beobachtungszeit von 180 Tagen war die rein muskelbehandelte Gruppe der BMP-2-Gruppe, was die histologischen Ergebnisse betraf, tendenziell überlegen. Weshalb sich der knorpelstimulierende Effekt von BMP-2 hier nicht zeigte, könnte durch die bereits beschriebenen methodischen Limitationen der Studie ergeben haben: gehäufte Verlust des Transplantats durch die sofortige volle Belastung der Gliedmaße oder entzündliche Fremdkörperreaktionen durch die Fäden wären als Ursachen denkbar.

Insgesamt muss aber an dieser Stelle nochmal betont werden, dass die Score-Ergebnisse der Muskel- und BMP-2-Gruppen sich bis auf die Ausnahme M Ad.BMP-2 (120) vs. M Ad.BMP-2 (180) nicht statistisch signifikant voneinander unterschieden und hohe Standardabweichungen aufwiesen, so dass hier eine verbesserte Knorpelheilung durch den Einsatz von BMP-2 gegenüber nativen Muskeltransplantaten nur vorsichtig postuliert werden kann.

Das beste und ein statistisch signifikantes Ergebnis erreichte schließlich die Leerdefektgruppe nach alleiniger Pridie-Bohrung, so dass sich ein Vorteil durch Einbringen eines reinen Ersatzgerüsts (autologes Muskelgewebe) in den Defekt zur verbesserten Einwanderung und Ansiedlung von Stammzellen oder Implantation einer BMP-2-transduzierten Trägersubstanz in chondrale Defekte in dieser Studie nicht ergab.

In einer ähnlichen Studie an Schafen (Ivkovic et al.) wurde mithilfe einer adenoviralen TGF- β 1-Gen-transduktion von autologem Knochenmarks-

aspirat die Regeneration von chondralen Teildefekten mit einem Durchmesser von 6,2 mm im medialen Femurkondylus untersucht (IVKOVIC et al., 2011). Die TGF- β 1 behandelte Gruppe unterschied sich histologisch nach sechs Monaten Beobachtungszeit ebenso kaum von der reinen Knochenmarksaspirat-Gruppe – lediglich der Anteil an Kollagen Typ II war höher. Die mit Wachstumsfaktor TGF stimulierten Defekte zeigten ansonsten ein vergleichbares histologisches Erscheinungsbild (unregelmäßige Füllung; fibrokartilaginöse und hyalinartige Strukturen im Füllgewebe) wie die Vergleichsgruppe mit unverändertem Knochenmarksaspirat. So konnte sich auch in diesem Schafversuch kein deutlich positiver Effekt eines Wachstumsfaktors auf die Knorpelheilung nachweisen lassen. Als große Hürde zeigte sich in allen Fällen zudem die Integration des Ersatzgewebes in den gesunden anliegenden Knorpel, wobei im Vergleich zur Kontrollgruppe (unbehandelte Leerdefekte) eine deutlich verbesserte Knorpelheilung stattfand. Dabei muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass keinerlei Eröffnung des subchondralen Raumes in der Kontroll- und den Therapiegruppen in der Studie von Ivkovic et al. stattfand im Gegensatz zur vorliegenden Studie, die die klinisch relevante Pridie-Bohrung als Standardtherapie als Vergleich heranzog. Die Eröffnung des subchondralen Knochenmarks hatte in unserem Fall eine verbesserte Knorpelreparatur zur Folge, so dass ein qualitativ besseres Füllgewebe entstand als reiner Faserknorpel.

Jelic et al. erzielte mit dem Wachstumsfaktor BMP-7 im Großtiermodell Schaf eine vielversprechende Regeneration von zwei chondralen Knorpeldefekten (in Trochlea und Femurkondyle; Durchmesser 10 mm) sogar ohne Trägersubstanz (JELIC et al., 2001). In beide Defekte wurde kontinuierlich rekombinantes BMP-7 über einen Zeitraum von zwei Wochen mithilfe einer implantierten mini-osmotischen Pumpe appliziert. Die chondralen Leerdefekte der Kontrollgruppe blieben im Beobachtungszeitraum von drei bzw. sechs Monaten ungefüllt, während die mit unterschiedlich hohen Dosierungen von BMP-7 behandelten Läsionen nach drei Monaten bereits mit Bindegewebe und Knorpel gefüllt waren; nach sechs Monaten enthielten die Defekte der Therapiegruppen hyalinähnliches Gewebe mit einem hohen Anteil an Kollagen II und

Proteoglykanen, das im Gegensatz zu den histologischen Resultaten unserer als auch weiterer Knorpelstudien (GRGIC et al., 1997; SELLERS et al., 1997; FRENKEL et al., 2000; SELLERS et al., 2000) gut an den angrenzenden gesunden Knorpel integriert war. Die Studie konnte zudem zeigen, dass BMP-7 das Einwachsen mesenchymaler Zellen aus dem synovialen Gewebe in den Defekt mit anschließender Transformation in knorpelähnliches Gewebe stimuliert. Unsere Daten deuten eher auf ein Einwandern von Stammzellen mit anschließender Umwandlung in Chondrozyten über die Bohrlöcher aus dem Knochenmarkraum hin, was auch die Inselbildung im Bereich dieser Zugänge erklärt.

Die histologischen Ergebnisse dieser Studie lieferten im Vergleich zur Literatur nur vage Hinweise auf den positiven Effekt von BMP-2 auf die Knorpelregeneration. Die Implantation von autologem Muskelfasziengewebe schien sich sogar störend auf die Knorpelheilung auszuwirken. Möglicherweise könnte die Verwendung eines alternativen autologen und transduzierten Gewebes wie Fett, eine Verlängerung der Standzeit auf ein Jahr oder auch der Einsatz eines anderen Wachstumsfaktors wie BMP-7 in einem Folgeversuch ein günstigeres histologisches Ergebnis liefern.

3. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Studie durch den Einsatz von BMP-2 über adenovirale Transduktion von autologem Muskelfasziengewebe keine Heilung von chondralen Defekten erzielt werden. Weder hinsichtlich der biomechanischen noch der histologischen Resultate war die zusätzliche Implantation weder von nativem noch von BMP-2 genaktiviertem Muskelgewebe gegenüber der klinisch etablierten Pridie-Bohrung überlegen. Es konnte nur andeutungsweise eine positive Wirkung von BMP-2 angesichts der geringgradig besseren histologischen Qualität des Ersatzgewebes gegenüber rein muskelbehandelten Gruppe nach einer Standzeit von 180 Tagen festgestellt werden. Auch die etwas längere Standzeit von sechs Monaten wirkte sich positiv auf die Füllung der Defekte und Struktur des knorpelähnlichen Gewebes aus.

In einer Pilotstudie an Kaninchen wurden erstmals autologe, adenoviral genmodifizierte Muskelgewebestücke zur Produktion von BMP-2 in

osteoochondrale Defekte im medialen Femurkondylus und in der Trochlea (\varnothing 3 mm) eingesetzt (EVANS et al., 2009). Nach sechs Wochen wiesen die BMP-2-behandelten Defekte gegenüber den nativen Muskelfaszienimplantaten eine deutlich verbesserte Knorpelheilung auf mit gut integriertem, knorpelähnlichem Reparaturgewebe mit einem hohen Proteoglykangehalt. Dies gelang auch im Übrigen mit der Verwendung BMP-2-transduzierten autologen Fettgewebes.

Im hier durchgeführten Großtiermodell ist dies nicht in dem Maße gelungen. Hinderlich für ein besseres Heilungsergebnis waren sicher die fehlende Rehabilitationsphase wie sie bei Menschen vorgesehen ist, die volle Belastung der Gliedmaße direkt nach der Operation und das Einnähen der Muskeltransplantate in den Knorpel, was theoretisch eine Irritation im Gelenk zur Folge gehabt haben könnte. Das Risiko des Ausreißens der Transplantate kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Der knorpelstimulierende und chondrogene Effekt von BMP-2 wurde bereits oftmals bewiesen (SELLERS et al., 2000; CARLBERG et al., 2001) und auch die Expression von BMP-2 über die transduzierten Muskelzellen wurde *in vitro* nachgewiesen. Für Folgeuntersuchungen ist die Verwendung von BMP-7 oder eine Kombination aus BMP-7 und IGF-1 interessant, da hier bereits ebenfalls positive Effekte auf die Knorpelheilung nachgewiesen wurden (JELIC et al., 2001; LOESER et al., 2003; FAN et al., 2004).

Bislang ist es in keiner Studie im Tiermodell gelungen, eine erfolgreiche Regeneration von chondralen oder osteochondralen Defekten mit ursprünglichem hyalinem Knorpel hervorzubringen. Die hier untersuchte kosten- und zeitsparende ex-vivo Methodik eines gentherapeutischen Ansatzes zur Heilung von Knorpeldefekten mithilfe von Wachstumsfaktoren stellt einen ersten, wenn noch weiter zu optimierenden Ansatz in der Entwicklung innovativer Therapieverfahren in der Orthopädie dar.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung von Knorpelläsionen stellt bis heute eine große Herausforderung in der orthopädischen Praxis aufgrund der stark limitierten Fähigkeit zur Selbstheilung von Gelenkknorpel dar. Aktuelle Therapiestrategien zielen unter anderem auf die Eröffnung des subchondralen Knochenmarkraumes ab, um so das Einwandern von Stamm- und Vorläuferzellen in den Defekt zu ermöglichen und eine Füllung des Defekts mit Reparaturgewebe zu erzielen. Daneben gibt es weitere konservative und operative Behandlungsmethoden, doch durch keines dieser Therapiekonzepte ist es bisher gelungen, physiologischen und biomechanisch stabilen Gelenkknorpel wiederherzustellen. Daher ist die Notwendigkeit zur Erforschung innovativer Therapieverfahren (z.B. Tissue Engineering) vorhanden.

Das Ziel dieser Studie war es, die Heilung chondraler Knorpeldefekte nach knochenmarksstimulierender Pridie-Bohrung kombiniert mit Implantation autologer, den Wachstumsfaktor BMP-2 (bone morphogenetic protein 2)-exprimierender Muskelfaszientransplantate zu untersuchen. Die Muskelfaszienstücke sollten neben einer kontinuierlichen BMP-2-Produktion auch als Lieferant und Leitgerüst für die Einwanderung und Ansiedlung von Stamm- und Vorläuferzellen dienen.

Zu diesem Zweck wurden bei 42 Merinoschafen zwei chondrale Volldefekte (\varnothing 8 mm) im lasttragenden Bereich des medialen Femurkondylus an der rechten Hintergliedmaße gesetzt. Bei allen Defekten wurde eine Pridie-Bohrung durchgeführt, wobei je nach Gruppenzugehörigkeit die Läsionen leer blieben (Kontrollgruppe) oder mit zuvor entnommenen, unbehandelten oder mit BMP-2-genaktivierten Muskelgewebezylindern mit anliegender Faszie durch Naht verschlossen wurden. Die Genaktivierung der Muskelgewebestücke fand *in vitro* unter Verwendung eines adenoviralen Vektors innerhalb von 40 Minuten während der laufenden Operation statt. Nach den Beobachtungszeitpunkten von 120 bzw. 180 Tagen wurde die Knorpelregeneration mithilfe eines biomechanischen Indentationstests als

auch mit histologischen (Safranin-Orange/Lichtgrün Färbung) und immunhistochemischen (Kollagen Typ I- und Kollagen Typ II-Färbung) Verfahren evaluiert. Dabei basierte die histologische, semiquantitative Bewertung der Defekte auf einem erweiterten Score von O'Driscoll.

Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, war die Behandlung chondraler Knorpeldefekte mit nativem als auch mit BMP-2-genaktiviertem Muskelfasziengewebe der alleinigen Pridie-Bohrung nicht überlegen. Insgesamt erreichte keine der Versuchsgruppen annähernd physiologische Werte von gesundem hyalinem Gelenkknorpel. In der Leerdefektgruppe wurde signifikant mehr Regenerationsgewebe im Defekt gefunden, welches sich sowohl biomechanisch als auch histologisch statistisch signifikant von den Füllgeweben der anderen Gruppen unterschied. Das Ersatzgewebe in den Defekten der Leerdefektgruppe wies allerdings maximal hyalinähnlichen Charakter auf und war mit physiologischem Gelenkknorpel nicht vergleichbar. Beim Vergleich der biomechanischen Resultate der mit nativen Muskelfaszien behandelten mit den BMP-2-therapierten Gruppen zeigte sich die native Muskelgruppe leicht überlegen bezüglich der Defektfüllung, wenn auch nicht statistisch signifikant. Auch histologisch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen festgestellt werden. Hinsichtlich der unterschiedlichen Standzeiten ergab sich ebenfalls keine aussagekräftige Differenz. Eine positive Wirkung von BMP-2 auf die Knorpelregeneration zeigte sich andeutungsweise in der etwas höheren Punktzahl für die BMP-2-Gruppe im erweiterten O'Driscoll-Score gegenüber der rein muskelbehandelten Gruppe mit einer Standzeit von 180 Tagen. Hier wies das Gewebe vermehrt hyalinähnliche Eigenschaften (höherer Kollagen Typ II-Anteil und Proteoglykangehalt) auf, war besser in den umliegenden Knorpel integriert und wies weniger Degenerationsanzeichen auf. Dennoch unterlag das Gewebe in den Kriterien „Dicke“ und „Gleichmäßigkeit der Oberfläche“ der nativ muskelfaszienbehandelten Gruppe punktmäßig.

Mit dieser Studie ließ sich ein knorpelstimulierender Effekt von BMP-2 auf die Regeneration chondraler Defekte nur ansatzweise nachweisen. Die Implantation von autologen faszienhaltigen Muskelgewebestücken, ob

nativ oder genaktiviert, wirkte sich sogar eher ungünstig auf die sonst ablaufende, intrinsische Knorpelheilung nach Pridie-Bohrung aus. Damit wären für weitere Untersuchungen des verwendeten gentherapeutischen Verfahrens der Einsatz einer alternativen Trägersubstanz (z.B. autologes Fettgewebe) oder eines anderen, knorpelstimulierenden Wachstumsfaktors (z.B. zu BMP-7) zu empfehlen.

VII. SUMMARY

Regeneration of chondral defects by implantation of BMP-2 genetically modified muscle fascia – a study in sheep.

To date, the treatment of articular cartilage lesions represents a major challenge in orthopedic clinical practice due to cartilage's very limited capacity for self repair. Current therapeutic strategies intent to stimulate subchondral bone marrow to allow migration of stem and progenitor cells into the defect site and promote filling with repair tissue. Besides, there are further conservative and surgical techniques, but none of these therapy concepts have succeeded in restoration of physiological and biomechanically stable articular cartilage so far. Therefore, an unmet need for the development of innovative therapy methods (e.g. tissue engineering) still exists.

The aim of this study was to assess the repair of chondral cartilage defects after Pridie's marrow stimulation drilling technique in combination with implantation of autologous, muscle fascia grafts expressing BMP-2 (bone morphogenetic protein 2). In addition to continuous production of BMP-2, pieces of muscle fascia should serve as supplier and framework for immigration and settlement of stem and progenitor cells.

For this purpose, two chondral full-thickness cartilage defects (\varnothing 8 mm) were created in the load bearing area of the medial femoral condyle on the right hind limb in 42 Merino sheep. All defects were treated with Pridie drilling. Depending on treatment groups, lesions were left empty (control group), or sealed with previously extracted, untreated or BMP-2 expressing fascia muscle tissues by seam. Gene activation in muscle tissue grafts was performed in vitro using an adenoviral vector within 40 minutes during surgery. After observation periods of 120 or 180 days, cartilage repair was assessed by indentation testing as well as by histological and immunohistochemical techniques (Safranin-O/Fast Green and collagen type I/II staining). Histological analysis was based on a semi-quantitative extended O'Driscoll score.

The results of this study show that treatment of chondral cartilage defects

by implantation of unmodified or BMP-2 gene-activated muscle fascia was not superior to sole Pridie drilling. Overall, none of the groups reached physiological values of healthy hyaline articular cartilage. Significantly more regeneration tissue was found in defects of the control group, showing both biomechanical and histological statistical significant differences to the defect repair tissues of the treatment groups. Nevertheless, the newly created tissue in most defects of the control group had only hyaline-like character and was not comparable to physiological articular cartilage. Comparing biomechanical results of native muscle fascia treated and BMP-2-treated groups, the native muscle group showed a slight superiority in cartilage defect filling, but not statistically relevant. Further, no significant difference was found concerning histology and different observation periods. An indication for a positive effect of BMP-2 on cartilage repair was set in a marginal higher score result for the BMP-2 group compared to the group treated with unmodified muscle fascia grafts with the longer healing period of 180 days. In this case, the repair tissue showed more hyaline-like properties (higher fraction of collagen type II and proteoglycans), it was better integrated into the surrounding cartilage and showed fewer signs of degeneration. However, the repair tissue was numerical inferior to defect filling in lesions of the unmodified muscle fascia group concerning criteria "thickness" and "surface regularity".

In this study, a stimulating effect of BMP-2 on cartilage repair for regeneration of chondral defects could be verified only to a small extent. The implantation of autologous muscle grafts containing fascia, whether native or BMP-2 gene activated, had an even negative effect on physiological intrinsic healing processes after Pridie drilling. Therefore, usage of an alternative scaffold (e.g. autologous adipose tissue) or another stimulating cartilage growth factor (e.g. for BMP-7) would be recommended for further investigations based on this gene therapy method.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adachi N, Pelinkovic D, Lee CW, Fu FH, Huard J. Gene therapy and the future of cartilage repair. *Operative Techniques in Orthopaedics* 2001; 11: 138-44.

Adachi N, Sato K, Usas A, Fu FH, Ochi M, Han CW, Niyibizi C, Huard J. Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *J Rheumatol* 2002; 29: 1920-30.

Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17: 705-13.

Akizuki S, Mow VC, Muller F, Pita JC, Howell DS, Manicourt DH. Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. *J Orthop Res* 1986; 4: 379-92.

Allen MJ, Houlton JE, Adams SB, Rushton N. The surgical anatomy of the stifle joint in sheep. *Vet Surg* 1998; 27: 596-605.

Appleyard RC, Swain MV, Khanna S, Murrell GA. The accuracy and reliability of a novel handheld dynamic indentation probe for analysing articular cartilage. *Phys Med Biol* 2001; 46: 541-50.

Athanasίου KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 1991; 9: 330-40.

Aubin PPM, Cheah HKM, Davis AMP, Gross AEM. Long-Term Followup of Fresh Femoral Osteochondral Allografts for Posttraumatic Knee Defects. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2001; 391: S318-S27.

Bae WC, Temple MM, Amiel D, Coutts RD, Niederauer GG, Sah RL. Indentation testing of human cartilage: sensitivity to articular surface degeneration. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3382-94.

Bai X, Li G, Zhao C, Duan H, Qu F. BMP7 induces the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal cells into chondrocytes. *Medical & biological*

engineering & computing 2011; 49: 687-92.

Bakker AC, van de Loo FA, van Beuningen HM, Sime P, van Lent PL, van der Kraan PM, Richards CD, van den Berg WB. Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 128-36.

Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RW, Flanagan AM, Briggs TW, Bentley G. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br* 2005; 87: 640-5.

Batty L, Dance S, Bajaj S, Cole BJ. Autologous chondrocyte implantation: an overview of technique and outcomes. *ANZ J Surg* 2011; 81: 18-25.

Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zukor DJ, Gross AE. Fresh osteochondral allografts for post-traumatic defects in the knee. A survivorship analysis. *J Bone Joint Surg Br* 1992; 74: 105-10.

Bedi A, Feeley BT, Williams RJ, 3rd. Management of articular cartilage defects of the knee. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 2010; 92: 994-1009.

Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *Knee* 2006; 13: 194-202.

Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2: 1-13.

Betz VM, Betz OB, Harris MB, Vrahas MS, Evans CH. Bone tissue engineering and repair by gene therapy. *Front Biosci* 2008; 13: 833-41.

Biant LC, Bentley G, Vijayan S, Skinner JA, Carrington RW. Long-term results of autologous chondrocyte implantation in the knee for chronic chondral and osteochondral defects. *Am J Sports Med* 2014; 42: 2178-83.

Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 597-604.

Bobic V. The utilisation of osteochondral autologous grafts in the treatment of articular cartilage lesions. *Der Orthopäde* 1999; 28: 19-25.

Bonutti PM, Seyler TM, Delanois RE, McMahon M, McCarthy JC, Mont MA. Osteonecrosis of the knee after laser or radiofrequency-assisted arthroscopy: treatment with minimally invasive knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88 Suppl 3: 69-75.

Brehm W, Aklın B, Yamashita T, Rieser F, Trub T, Jakob RP, Mainil-Varlet P. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2006; 14: 1214-26.

Breinan HAP, Hsu HPM, Spector MP. Chondral Defects in Animal Models: Effects of Selected Repair Procedures in Canines. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2001; 391: S219-S30.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-95.

Brittberg M. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *The American Journal of Sports Medicine* 2010; 38: 1259-71.

Bruns J, Kersten P, Lierse W, Silbermann M. Autologous rib perichondrial grafts in experimentally induced osteochondral lesions in the sheep-knee joint: morphological results. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 421: 1-8.

Bruns J, Behrens P, Silbermann M. [The principle of autogeneic rib perichondrial transplantation in the treatment of deep articular cartilage defects]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1997; 135: 138-44.

Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *The Journal*

of orthopaedic and sports physical therapy 1998; 28: 192-202.

Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instructional course lectures 1998; 47: 487-504.

Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. Instructional course lectures 2005; 54: 465-80.

Buma P, Schreurs W, Verdonschot N. Skeletal tissue engineering-from in vitro studies to large animal models. Biomaterials 2004; 25: 1487 - 95.

Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. Clin Orthop Relat Res 1992: 250-72.

Campbell CJ. The healing of cartilage defects. Clinical orthopaedics and related research 1969; 64: 45-63.

Cao H, Koehler DR, Hu J. Adenoviral vectors for gene replacement therapy. Viral Immunol 2004; 17: 327-33.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells and gene therapy. Clin Orthop Relat Res 2000: S67-70.

Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R, Tuan RS, Hall DJ. Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. Differentiation 2001; 67: 128-38.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth Factors 2004; 22: 233-41.

Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. Repair of articular cartilage defects: part I. Basic Science of cartilage healing. Am J Orthop (Belle Mead NJ) 1999; 28: 31-3.

Cheung HS, Cottrell WH, Stephenson K, Nimni ME. In vitro collagen biosynthesis in healing and normal rabbit articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 1978; 60: 1076-81.

Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Buschmann MD. Chitosan-glycerol

phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 316-27.

Chu CR, Convery FR, Akeson WH, Meyers M, Amiel D. Articular cartilage transplantation. Clinical results in the knee. *Clin Orthop Relat Res* 1999: 159-68.

Chu CR. Chondral and osteochondral injuries: Mechanisms of injury and repair responses. *Operative Techniques in Orthopaedics* 2001; 11: 70-5.

Cole BJ, D'Amato M. Autologous chondrocyte implantation. *Operative Techniques in Orthopaedics* 2001; 11: 115-31.

Cole BJ, Pascual-Garrido C, Grumet RC. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. *J Bone Joint Surg Am* 2009; 91: 1778-90.

Convery FR, Akeson WH, Keown GH. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop Relat Res* 1972; 82: 253-62.

Cook SD, Patron LP, Salkeld SL, Rueger DC. Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein-1 (BMP-7) in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A Suppl 3: 116-23.

Curwin S. Joint Structure and Function. In: *Joint Structure and Function - A comprehensive analysis*, 5. edn. Levangie P.K. NCC, ed.: F.A. Davis Company 2011: S. 64 - 78.

Czitrom AA, Langer F, McKee N, Gross AE. Bone and cartilage allotransplantation. A review of 14 years of research and clinical studies. *Clin Orthop Relat Res* 1986: 141-5.

Czitrom AA, Keating S, Gross AE. The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1990; 72: 574-81.

Dandy DJ. Abrasion chondroplasty. *Arthroscopy* 1986; 2: 51-3.

Dattena M, Pilichi S, Rocca S, Mara L, Casu S, Masala G, Manunta L, Manunta

A, Passino ES, Pool RR, Cappai P. Sheep embryonic stem-like cells transplanted in full-thickness cartilage defects. *J Tissue Eng Regen Med* 2009; 3: 175-87.

De Franceschi L, Grigolo B, Roseti L, Facchini A, Fini M, Giavaresi G, Tschon M, Giardino R. Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A* 2005; 75: 612-22.

Dekel S, Weissman SL. Joint changes after overuse and peak overloading of rabbit knees in vivo. *Acta Orthop Scand* 1978; 49: 519-28.

Dorotka R, Windberger U, Macfelda K, Bindreiter U, Toma C, Nehrer S. Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix. *Biomaterials* 2005a; 26: 3617-29.

Dorotka R, Bindreiter U, Macfelda K, Windberger U, Nehrer S. Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 2005b; 13: 655-64.

Elshaier AM, Hakimiyan AA, Rappoport L, Rueger DC, Chubinskaya S. Effect of interleukin-1beta on osteogenic protein 1-induced signaling in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 143-54.

Erggelet C. Die operative Behandlung von Gelenkknorpel-Defekten. *Arthroskopie Aktuell* 1998;

Erggelet C, Endres M, Neumann K, Morawietz L, Ringe J, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. *Journal of Orthopaedic Research* 2009; 27: 1353-60.

Evans CH, Gouze JN, Gouze E, Robbins PD, Ghivizzani SC. Osteoarthritis gene therapy. *Gene therapy* 2004; 11: 379-89.

Evans CH, Palmer GD, Pascher A, Porter R, Kwong FN, Gouze E, Gouze JN, Liu F, Steinert A, Betz O, Betz V, Vrahas M, Ghivizzani SC. Facilitated endogenous repair: making tissue engineering simple, practical, and economical. *Tissue engineering* 2007; 13: 1987-93.

Evans CH, Liu FJ, Glatt V, Hoyland JA, Kirker-Head C, Walsh A, Betz O, Wells JW, Betz V, Porter RM, Saad FA, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Harris MB, Vrahas MS. Use of genetically modified muscle and fat grafts to repair defects in bone and cartilage. *Eur Cell Mater* 2009; 18: 96-111.

Fan Z, Chubinskaya S, Rueger DC, Bau B, Haag J, Aigner T. Regulation of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic adult human articular chondrocytes by osteogenic protein-1. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22: 103-6.

Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007; 39: 175-91.

Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 2011; 469: 2706-15.

Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 11-23.

Frenkel SR, Di Cesare PE. Degradation and repair of articular cartilage. *Front Biosci* 1999; 4: D671-85.

Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105: 980-90.

Friedman MJ, Berasi CC, Fox JM, Del Pizzo W, Snyder SJ, Ferkel RD. Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. *Clin Orthop Relat Res* 1984: 200-5.

Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006a; 19: 142-6.

Frisbie DD, Morisset S, Ho CP, Rodkey WG, Steadman JR, McIlwraith CW.

Effects of Calcified Cartilage on Healing of Chondral Defects Treated With Microfracture in Horses. *The American Journal of Sports Medicine* 2006b; 34: 1824-31.

Fuller JA, Ghadially FN. Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1972; 86: 193-205.

Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 1980; 62: 79-89.

Fuss M, Ehlers EM, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Ann Anat* 2000; 182: 303-10.

Giannoni P, Cancedda R. Articular chondrocyte culturing for cell-based cartilage repair: needs and perspectives. *Cells Tissues Organs* 2006; 184: 1-15.

Glowacki J, Trepman E, Folkman J. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 172: 93-8.

Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, Kon E. The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 2010; 18: 434-47.

Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Borner MG, Chiron P, Choong P, Cinats J, Courtenay B, Feibel R, Geulette B, Gravel C, Haas N, Raschke M, Hammacher E, van der Velde D, Hardy P, Holt M, Josten C, Ketterl RL, Lindeque B, Lob G, Mathevon H, McCoy G, Marsh D, Miller R, Munting E, Oevre S, Nordsletten L, Patel A, Pohl A, Rennie W, Reynders P, Rommens PM, Rondia J, Rossouw WC, Daneel PJ, Ruff S, Ruter A, Santavirta S, Schildhauer TA, Gekle C, Schnettler R, Segal D, Seiler H, Snowdowne RB, Stapert J, Taglang G, Verdonk R, Vogels L, Weckbach A, Wentzensen A, Wisniewski T, Group BMPEiSfTTS. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective,

controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84-A: 2123-34.

Grgic M, Jelic M, Basic V, Basic N, Pecina M, Vukicevic S. Regeneration of articular cartilage defects in rabbits by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7). *Acta Med Croatica* 1997; 51: 23-7.

Guettler JH, Demetropoulos CK, Yang KH, Jurist KA. Osteochondral defects in the human knee: influence of defect size on cartilage rim stress and load redistribution to surrounding cartilage. *Am J Sports Med* 2004; 32: 1451-8.

Guilak F, Estes BT, Diekmann BO, Moutos FT, Gimple JM. 2010 Nicolas Andry Award: Multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering. *Clinical orthopaedics and related research* 2010; 468: 2530-40.

Hangody LMDPD, Feczko PMD, Bartha LMD, Bodo GDVM, Kish GMD. Mosaicplasty for the Treatment of Articular Defects of the Knee and Ankle. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2001; 391: S328-S36.

Hardingham TE. Fell-Muir Lecture: Cartilage 2010 – The Known Unknowns. *Int J Exp Pathol* 2010a; 91: 203-9.

Hardingham TE. Fell-Muir lecture: cartilage 2010 - the known unknowns. *Int J Exp Pathol* 2010b; 91: 203-9.

Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 2003; 21: 573-83.

Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD. Chitosan-Glycerol Phosphate/Blood Implants Improve Hyaline Cartilage Repair in Ovine Microfracture Defects. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 2671-86.

Hou JS, Mow VC, Lai WM, Holmes MH. An analysis of the squeeze-film lubrication mechanism for articular cartilage. *J Biomech* 1992; 25: 247-59.

Hunter W. Of the Structure and Disease of Articulating Cartilages. Clinical Orthopaedics & Related Research August 1995; 317: 3-6.

Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. The Journal of bone and joint surgery. American volume 1996; 78: 721-33.

Hunziker EBM, Driesang IMKD, Morris EAD. Chondrogenesis in Cartilage Repair is Induced by Members of the Transforming Growth Factor-Beta Superfamily. Clinical Orthopaedics & Related Research 2001; 391: S171-S81.

Hurschler C, Abedian R. Möglichkeiten der biomechanischen Charakterisierung von Knorpelgewebe. Der Orthopäde 2013; 42: 232-41.

Insall J. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. Clin Orthop Relat Res 1974: 61-7.

Ivkovic A, Pascher A, Hudetz D, Maticic D, Jelic M, Dickinson S, Loparic M, Haspl M, Windhager R, Pecina M. Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. Gene Ther 2011; 17: 779-89.

Jansson V, Muller PE, Thal S, Arnholz C, Milz S, Koch KU, Refior HJ. [A new resorbable bone-cartilage replacement transplant. Results of an animal experiment study]. Orthopade 2000; 29: 151-7.

Jelic M, Pecina M, Haspl M, Kos J, Taylor K, Maticic D, McCartney J, Yin S, Rueger D, Vukicevic S. Regeneration of articular cartilage chondral defects by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in sheep. Growth Factors 2001; 19: 101-13.

Johnson LLMD. Arthroscopic Abrasion Arthroplasty: A Review. Clinical Orthopaedics & Related Research 2001; 391: S306-S17.

Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauck RL, Semino CE, Stoddart MJ. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. Eur Cell Mater 2013; 25: 248-67.

Jortikka MO, Inkinen RI, Tammi MI, Parkkinen JJ, Haapala J, Kiviranta I,

Helminen HJ, Lammi MJ. Immobilisation causes longlasting matrix changes both in the immobilised and contralateral joint cartilage. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 255-61.

Jubel A, Andermahr J, Schiffer G, Fischer Jr, Rehm KE, Stoddart MJ, Häuselmann HJ. Transplantation of De Novo Scaffold-Free Cartilage Implants Into Sheep Knee Chondral Defects. *The American Journal of Sports Medicine* 2008; 36: 1555-64.

Jurvelin J, Kiviranta I, Saamanen AM, Tammi M, Helminen HJ. Indentation stiffness of young canine knee articular cartilage--influence of strenuous joint loading. *J Biomech* 1990; 23: 1239-46.

Kandel RA, Grynpas M, Pilliar R, Lee J, Wang J, Waldman S, Zalzal P, Hurtig M. Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a sheep model. *Biomaterials* 2006; 27: 4120-31.

Katanec D, Granic M, Majstorovic M, Trampus Z, Panduric DG. Use of recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP2) in bilateral alveolar ridge augmentation: case report. *Coll Antropol* 2014; 38: 325-30.

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001; 7: 33-40.

Kempson GE, Muir H, Swanson SA, Freeman MA. Correlations between stiffness and the chemical constituents of cartilage on the human femoral head. *Biochim Biophys Acta* 1970; 215: 70-7.

Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta* 1973; 297: 456-72.

Kessler MW, Grande DA. Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis* 2008; 4: 28-32.

Kim HK, Moran ME, Salter RB. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 1991; 73: 1301-15.

Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Saamanen AM, Helminen HJ. Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 801-9.

Kleemann RU, Schell H, Thompson M, Epari DR, Duda GN, Weiler A. Mechanical behavior of articular cartilage after osteochondral autograft transfer in an ovine model. *Am J Sports Med* 2007; 35: 555-63.

Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Fini M, Giavaresi G, Francioli S, Martin I, Pressato D, Arcangeli E, Quarto R, Sandri M, Marcacci M. Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial. *J Orthop Res* 2009; 28: 116 - 24.

Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR, Krause SJ, Lahm A, Niemeyer P, Ghanem N, Uhl M, Sudkamp N. Is microfracture of chondral defects in the knee associated with different results in patients aged 40 years or younger? *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 2006; 22: 1180-6.

Kuroda R, Usas A, Kubo S, Corsi K, Peng H, Rose T, Cummins J, Fu FH, Huard J. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 433-42.

Lai WM, Hou JS, Mow VC. A triphasic theory for the swelling and deformation behaviors of articular cartilage. *J Biomech Eng* 1991; 113: 245-58.

Lane JM, Brighton CT, Ottens HR, Lipton M. Joint resurfacing in the rabbit using an autologous osteochondral graft. *J Bone Joint Surg Am* 1977; 59: 218-22.

Langer R. Tissue engineering. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2000; 1: 12-5.

Lanza R, Langer R, Vacanti JP (2011) Principles of tissue engineering. Academic press

Linn FC, Sokoloff L. Movement and Composition of Interstitial Fluid of Cartilage. *Arthritis Rheum* 1965; 8: 481-94.

Loeser RF, Pacione CA, Chubinskaya S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2188-96.

Louwerse RT, Heyligers IC, Klein-Nulend J, Sugihara S, van Kampen GP, Semeins CM, Goei SW, de Koning MH, Wuisman PI, Burger EH. Use of recombinant human osteogenic protein-1 for the repair of subchondral defects in articular cartilage in goats. *J Biomed Mater Res* 2000; 49: 506-16.

Lu XL, Mow VC. Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40: 193-9.

Madry H, Trippel SB. Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther* 2000; 7: 286-91.

Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts). *N Engl J Med* 1974a; 291: 1285-92.

Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (second of two parts). *N Engl J Med* 1974b; 291: 1335-40.

Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982; 64: 460-6.

Marconi P, Argnani R, Berto E, Epstein AL, Manservigi R. HSV as a vector in vaccine development and gene therapy. *Hum Vaccin* 2008; 4: 91-105.

Marlovits S. Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten Teil 1. 2000;

Marlovits S, Vécsei V. Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten — Teil 1: Grundlagen der Korpelbiologie und der Heilung von Knorpeldefekten. *European Surgery* 2000a; 32: 124-9.

Marlovits S, Vécsei V. Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten — Teil 2: Chirurgische Behandlungsoptionen zur biologischen Knorpelreparatur. *European Surgery* 2000b; 32: 185-94.

Marlovits S, Striessnig G, Kutscha-Lissberg F, Resinger C, Aldrian SM, Vecsei V, Trattnig S. Early postoperative adherence of matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of full-thickness cartilage defects of the femoral condyle. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005; 13: 451-7.

Maroudas A, Bannan C. Measurement of swelling pressure in cartilage and comparison with the osmotic pressure of constituent proteoglycans. *Biorheology* 1981; 18: 619-32.

Marquass B, Somerson JS, Hepp P, Aigner T, Schwan S, Bader A, Josten C, Zscharnack M, Schulz RM. A novel MSC-seeded triphasic construct for the repair of osteochondral defects. *Journal of Orthopaedic Research* 2010; 28: 1586-99.

Martin JA, Buckwalter JA. Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. *Iowa Orthop J* 2001; 21: 1-7.

Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep Model in Orthopedic Research: A Literature Review. *Comparative Medicine* 2001; 51: 292-9.

McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 1022-33.

McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop* 2007; 31: 729-34.

Melton JT, Cossey AJ. Techniques for cartilage repair in chondral and osteochondral defects of the knee. *Acta orthopaedica Belgica* 2011; 77: 152-9.

Menche DS, Frenkel SR, Blair B, Watnik NF, Toolan BC, Yaghoubian RS, Pitman MI. A comparison of abrasion burr arthroplasty and subchondral drilling in the treatment of full-thickness cartilage lesions in the rabbit. *Arthroscopy* 1996; 12: 280-6.

Menendez MI, Clark DJ, Carlton M, Flanigan DC, Jia G, Sammet S, Weisbrode SE, Knopp MV, Bertone AL. Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model. *Osteoarthritis Cartilage* 2011; 19: 1066-75.

Messner K, Maletius W. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand* 1996; 67: 165-8.

Milano G, Sanna Passino E, Deriu L, Careddu G, Manunta L, Manunta A, Saccomanno MF, Fabbriani C. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis and Cartilage* 2010; 18: 971-80.

Minas T, Peterson L. Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation. *Clin Sports Med* 1999; 18: 13-44, v-vi.

Minas T, Gomoll AH, Solhpour S, Rosenberger R, Probst C, Bryant T. Autologous chondrocyte implantation for joint preservation in patients with early osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2010; 468: 147-57.

Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am* 1976; 58: 230-3.

Mithoefer K, Williams RJ, 3rd, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, Wickiewicz TL, Marx RG. Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 2006; 88 Suppl 1 Pt 2: 294-304.

Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *The American Journal of Sports Medicine* 2009; 37: 2053-63.

Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression? Theory and experiments. *J Biomech Eng* 1980; 102: 73-84.

Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech* 1984; 17: 377-94.

Mow VC, Gibbs MC, Lai WM, Zhu WB, Athanasiou KA. Biphasic indentation of

articular cartilage--II. A numerical algorithm and an experimental study. *J Biomech* 1989; 22: 853-61.

Mow VC, Ateshian GA, Spilker RL. Biomechanics of diarthrodial joints: a review of twenty years of progress. *J Biomech Eng* 1993; 115: 460-7.

Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 2010; 16: 123-45.

Newman AP. Articular cartilage repair. *The American Journal of Sports Medicine* 1998; 26: 309-24.

Nixon AJ, Goodrich LR, Scimeca MS, Witte TH, Schnabel LV, Watts AE, Robbins PD. Gene Therapy in Musculoskeletal Repair. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1117: 310-27.

O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 1986; 68: 1017-35.

Oakeshott RD, Farine I, Pritzker KP, Langer F, Gross AE. A clinical and histologic analysis of failed fresh osteochondral allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1988: 283-94.

Orth P, Zurakowski D, Wincheringer D, Madry H. Reliability, reproducibility, and validation of five major histological scoring systems for experimental articular cartilage repair in the rabbit model. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18: 329-39.

Osterhoff G, Loffler S, Steinke H, Feja C, Josten C, Hepp P. Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. *Knee* 2010; 18: 98-103.

Outerbridge HK, Outerbridge AR, Outerbridge RE. The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77: 65-72.

Pan RY, Chen SL, Xiao X, Liu DW, Peng HJ, Tsao YP. Therapy and prevention of arthritis by recombinant adeno-associated virus vector with delivery of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 289-97.

Park J, Gelse K, Frank S, von der Mark K, Aigner T, Schneider H. Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *The journal of gene medicine* 2006; 8: 112-25.

Park S, Hung CT, Ateshian GA. Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading at physiological stress levels. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004; 12: 65-73.

Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 2002; 30: 2-12.

Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat (Basel)* 1992; 143: 335-40.

Poole ARPD, Kojima TMDP, Yasuda TMDP, Mwale FP, Kobayashi MMDP, Lavery SMVBDA. Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2001; 391: S26-S33.

Rabenberg M (2013) Arthrose. In: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Ed Koch-Institut R, Berlin

Raghunath J, Rollo J, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM. Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnol Appl Biochem* 2007; 46: 73-84.

Raunest J, Derra E. [Laser-assisted induction of arthrosis]. *Orthopade* 1996; 25: 10-6.

Reddi AH. Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 Suppl 2: ii73-8.

Reddi AH. BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor Rev 2005; 16: 249-50.

Redler I, Mow VC, Zimny ML, Mansell J. The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. Clin Orthop Relat Res 1975: 357-62.

Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. Microsc Res Tech 1994; 28: 385-97.

Rudert M, Wirth CJ. Knorpelregeneration und Knorpelersatz. Der Orthopäde 1998; 27: 309-21.

Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. J Orthop Res 1996; 14: 937-45.

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. Arthritis & Rheumatism 2005; 52: 2521-9.

Sanal M. Does fibrin glue cause foreign body reactions? Eur J Pediatr Surg 1993; 3: 190.

Saris DB, Dhert WJ, Verbout AJ. Joint homeostasis. The discrepancy between old and fresh defects in cartilage repair. J Bone Joint Surg Br 2003; 85: 1067-76.

Scaduto AA, Lieberman JR. Gene therapy for osteoinduction. Orthop Clin North Am 1999; 30: 625-33.

Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. Nat Genet 1998; 18: 180-3.

Schinhan M, Gruber M, Vavken P, Dorotka R, Samouh L, Chiari C, Gruebl-Barabas R, Nehrer S. Critical-size defect induces unicompartmental osteoarthritis in a stable ovine knee. Journal of orthopaedic research : official publication of the

Orthopaedic Research Society 2012; 30: 214-20.

Schlichting K, Schell H, Kleemann RU, Schill A, Weiler A, Duda GN, Epari DR. Influence of scaffold stiffness on subchondral bone and subsequent cartilage regeneration in an ovine model of osteochondral defect healing. *The American Journal of Sports Medicine* 2008; 36: 2379-91.

Schmid A, Schmid F, Tiling T. Electron Microscope Findings After Cartilage Shaving. In: *Surgery and Arthroscopy of the Knee*. Müller W, Hackenbruch W, eds.: Springer Berlin Heidelberg 1988: 426-32.

Schmitt B, Ringe J, Haupl T, Notter M, Manz R, Burmester GR, Sittinger M, Kaps C. BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation; research in biological diversity* 2003; 71: 567-77.

Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 62-70.

Schwartz MA. Structure and function of cartilage biology. In: *Cartilage injury in the athlete*. Mirzayan R, ed. New York: Thieme 2006: S. 3-9.

Seedhom BB, Luo ZJ, Goldsmith AJ, Toyoda T, Lorrison JC, Guardamagna L. In-situ engineering of cartilage repair: a pre-clinical in-vivo exploration of a novel system. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers -- Part H -- Journal of Engineering in Medicine (Professional Engineering Publishing)* 2007; 221: 475-88.

Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 1997; 79: 1452-63.

Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, Beckwith K, Morris EA. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *The Journal of*

bone and joint surgery. American volume 2000; 82: 151-60.

Seo S-S, Kim C-W, Jung D-W. Management of Focal Chondral Lesion in the Knee Joint. *Knee Surg Relat Res* 2011; 23: 185-96.

Sgaglione NA, Miniaci A, Gillogly SD, Carter TR. Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee. *Arthroscopy* 2002; 18: 9-32.

Shao X, Goh JC, Hutmacher DW, Lee EH, Zigang G. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Tissue Eng* 2006; 12: 1539-51.

Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell Origin and Differentiation in the Repair of Full-Thickness Defects of Articular-Cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 1993a; 75A: 532-53.

Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993b; 75: 532-53.

Shasha N, Krywulak S, Backstein D, Pressman A, Gross AE. Long-term follow-up of fresh tibial osteochondral allografts for failed tibial plateau fractures. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A Suppl 2: 33-9.

Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H, Ma DD, Diwan AD. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J Cell Biochem* 2010; 109: 406-16.

Siebert CH, Miltner O, Weber M, Sopka S, Koch S, Niedhart C. Healing of osteochondral grafts in an ovine model under the influence of bFGF. *Arthroscopy* 2003; 19: 182-7.

Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater* 2009; 21: 3307-29.

Smith P, Shuler FD, Georgescu HI, Ghivizzani SC, Johnstone B, Niyibizi C,

Robbins PD, Evans CH. Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1156-64.

Statistisches Bundesamt W. Gesundheit - Krankheitskosten - 2002, 2004, 2006 und 2008. 2010; Fachserie 12 Reihe 7.2

Statistisches Bundesamt W. "Hüft- oder Kniegelenksarthrosen sind häufigster Behandlungsgrund in der Reha". 2013: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/01/P_D13_030_231.html

Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Operative Techniques in Orthopaedics* 1997; 7: 300-4.

Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 2003; 19: 477-84.

Steinert AF, Noth U, Tuan RS. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury* 2008; 39 Suppl 1: S97-113.

Tillmann. Skelettsystem. In: *Anatomie des Menschen*. Leonhardt H. TB, Töndury G., Zilles K., ed. Stuttgart: Thieme 1987: 52 - 127.

Trattinig S, Ba-Ssalamah A, Pinker K, Plank C, Vecsei V, Marlovits S. Matrix-based autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: noninvasive monitoring by high-resolution magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 2005; 23: 779-87.

Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 235-8.

Uppanan P, Thavornnyutikarn B, Kosorn W, Kaewkong P, Janvikul W. Enhancement of chondrocyte proliferation, distribution, and functions within polycaprolactone scaffolds by surface treatments. *J Biomed Mater Res A* 2014;

Urist MR, Strates BS. The classic: Bone morphogenetic protein. Clin Orthop Relat Res 2009; 467: 3051-62.

Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. Plast Reconstr Surg 1991; 88: 753-9.

van Dyk GE, Dejardin LM, Flo G, Johnson LL. Cancellous bone grafting of large osteochondral defects: an experimental study in dogs. Arthroscopy 1998; 14: 311-20.

Venn MF. Variation of chemical composition with age in human femoral head cartilage. Ann Rheum Dis 1978; 37: 168-74.

Vizesi F, Oliver R, Smitham P, Gothelf T, Yu Y, Walsh WR. Influence of surgical preparation on the in-vivo response of osteochondral defects. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers -- Part H -- Journal of Engineering in Medicine (Professional Engineering Publishing) 2007; 221: 489-98.

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. The Journal of bone and joint surgery. American volume 1994; 76: 579-92.

Wei X, Gao J, Messner K. Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint. J Biomed Mater Res 1997; 34: 63-72.

Williams RJ, 3rd, Dreese JC, Chen CT. Chondrocyte survival and material properties of hypothermically stored cartilage: an evaluation of tissue used for osteochondral allograft transplantation. Am J Sports Med 2004; 32: 132-9.

IX. ANHANG

„Entparaffinierungsreihe“ (absteigende Alkoholreihe)		
1.	Rotihistol I	10 min
2.	Rotihistol II	10 min
3.	Ethanol 99% I	5 min
4.	Ethanol 99% II	5 min
5.	Ethanol 96%	5 min
6.	Ethanol 70%	5 min
7.	Aqua destillata	5 min

Tabelle 7: Protokoll der absteigenden Alkoholreihe

Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung	
1,5% Safranin-Orange (3 g Safranin T ⁴⁶ + 200 ml Aqua dest.)	10 Min.
Aqua dest.	6 x dippen
Aqua dest.	6 x dippen
Aqua dest.	6 x dippen
0,02% Lichtgrün (0,02 g Echt-Grün ⁴⁷ + 100 ml 96%-Ethanol)	10 – 30 Sek.
1% Eisessig (198 ml Aqua dest. + 2 ml Essigsäure)	8 x dippen
Aqua dest.	6 x dippen (sofort)
96% Ethanol	8 x dippen (sofort)
99% Ethanol	8 x dippen
99% Ethanol	8 x dippen
Rotihistol I	10 Min.
Rotihistol II	10 Min.
Rotihistol III	10 Min
Rotihistol IV	10 Min. – eindecken mit DPX ⁴⁸ und 40 x 50 mm Deckgläschen

Tabelle 8: Färbeprotokoll der Safranin-Orange/Lichtgrün-Färbung

⁴⁶ Safranin T Pulver, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

⁴⁷ Echt-Grün FCF, Chroma-Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

⁴⁸ DPX (Distyrene Plasticizer Xylene) Mountant, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Kollagen Typ I und Typ II-Färbung	
Tag 1:	
Waschpuffer 0,1% (5 Liter PBS + 5 ml Brij ⁴⁹)	10 Min.
Proteinase XXIV ⁵⁰	30 Min., 37°C
Waschpuffer 0,1%	3 x 5 Min.
Methanol (100%) + H ₂ O ₂ (30%)	30 Min., Raumtemperatur
Waschpuffer 0,1%	3 x 5 Min.
Chondroitinase AC ⁵¹	30 Min., 37°C
Waschpuffer 0,1%	3 x 5 Min.
Pferde ⁵² - und Ziegenserum ⁵³ (je 1:20)	1 Std., Raumtemperatur
Collagen I - Antikörper ⁵⁴ (1:1000) bzw. Collagen II - Antikörper (CIIC1) ⁵⁵ (1:6)	Über Nacht, +4°C
Tag 2:	
Waschpuffer 0,1%	3 x 5 Min.
Horse anti-mouse Antikörper ⁵⁶ (biotinyliert) (1:200)	30 Min., Raumtemperatur
Waschpuffer 0,1%	3 x 5 Min.
ABC-Komplex ⁵⁷	30 Min., Raumtemperatur
Waschpuffer 0,1%	3 x 5 Min.
Impact DAB ⁵⁸	Im Dunkeln, 4 Min., Raumtemperatur
Aqua dest.	2 Min. um Reaktion zu stoppen
Mayers Hämalaun Lösung ⁵⁹	2 Min., Färben der Zellkerne
Fließendes Leitungswasser	10 Min., wässern
Aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol, 80% Ethanol, 96% Ethanol, 99% Ethanol, 99% Ethanol)	Jeweils 5 Min.
4 x Rotihistol	Jeweils 10 Min.
	Eindecken mit DPX und 40 x 50 mm Deckgläschen

Tabelle 9: Färbeprotokoll der Kollagen Typ I und II-Färbung

⁴⁹ Brij 58 (Polyethylen Glykol Hexadecyl Ether), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

⁵⁰ Proteinase XXIV Lyophilisat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

⁵¹ Chondroitinase AC Lyophilisat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

⁵² Normal Horse Serum (NHS), BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland

⁵³ Goat Serum (normal), Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

⁵⁴ Collagen I-AK, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

⁵⁵ Collagen type II (CIIC1), Isotype: IgG2a, Antigen Species: Chicken, Host Species: Mouse, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), University of Iowa, Iowa, USA

⁵⁶ Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG Antibody, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

⁵⁷ Vectastain Elite ABC Kit (Standard*), Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

⁵⁸ ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

⁵⁹ Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

BMP-2-Konzentration ng/ml	Muskel mit Faszie		Muskel ohne Faszie	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Tag 3	22,23	14,25	7,57	1,58
Tag 6	225,29	80,32	41,16	11,95
Tag 9	321,47	174,89	77,39	33,54
Tag 12	395,68	220,81	259,39	60,89
Tag 15	1046,69	276,09	446,77	69,96
Tag 18	935,85	199,08	468,86	50,24
Tag 21	699,71	25,48	387,33	225,71
Tag 24	1116,31	230,89	522,60	268,17
Tag 27	525,15	39,15	498,48	273,21
Tag 30	225,49	70,53	306,21	182,96

Tabelle 10: Datentabelle zu ELISA 1. Vergleich der BMP-2-Konzentrationen von transduziertem Muskelgewebe mit anliegender Faszie (MF 1 und MF 2) und von transduzierten reinen Muskelgewebestücken (M1 und M2).

BMP-2-Konzentration ng/ml	Mittelwert	Standardabweichung
Tag 3	551,02	556,70
Tag 7	1714,97	60,16
Tag 10	1514,76	236,83
Tag 13	1413,67	225,39
Tag 16	1711,79	391,57
Tag 20	1177,73	745,69
Tag 23	528,75	654,48
Tag 26	549,79	385,46
Tag 29	479,18	531,80
Tag 33	545,72	701,63

Tabelle 11: Datentabelle zu Abbildung 40 (ELISA 2). Messung der BMP-2-Konzentration über einen Zeitraum von 33 Tagen.

BMP-2 Konzentration ng/ml	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Mittelwert	Standard- abweichung
Tag 3	208,35	631,54	1303,17	61,01	551,02	556,70
Tag 7	1692,09	1801,01	1661,74	1705,06	1714,97	60,16
Tag 10	1382,47	1836,50	1541,07	1299,00	1514,76	236,83
Tag 13	1423,83	1610,83	1524,43	1095,61	1413,67	225,39
Tag 16	1908,21	1900,87	1913,60	1124,49	1711,79	391,57
Tag 20	1939,79	1622,58	858,19	290,35	1177,73	745,69
Tag 23	331,47	1501,18	146,92	135,42	528,75	654,48
Tag 26	565,46	1064,04	427,41	142,27	549,79	385,46
Tag 29	233,08	1265,47	318,01	100,17	479,18	531,80
Tag 33	161,12	1355,54	120,49	-	545,72	701,63

Tabelle 12: BMP-2-Konzentrationen der einzelnen Proben aus ELISA 2 in ng/ml.

Konzentration BMP-2 ng/ml	85		86		87		88	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Tag 3	134,17	1,95	106,63	13,63	99,75	3,89	266,33	36,99
Tag 6	366,83	42,83	965,69	5,84	607,75	17,52	465,95	27,26
Tag 9	500,37	33,10	230,54	36,99	770,20	52,57	912,00	46,73
Tag 12	326,90	56,46	219,52	48,67	556,81	54,51	983,58	3,89
Konzentration BMP-2 ng/ml	89		90		91		92	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Tag 3	112,14	5,84	65,33	1,95	0,00	0,00	0,00	0,00
Tag 6	291,11	1,95	335,16	17,52	112,14	9,73	198,87	0,00
Tag 9	576,08	167,44	945,04	42,83	161,70	1,95	728,90	9,73
Tag 12	767,44	25,31	717,88	25,31	237,42	38,94	1308,48	66,20

Tabelle 13: Datentabelle zu ELISA 3 (Mittelwert und Standardabweichung) für die Proben der Tiere 85 – 92

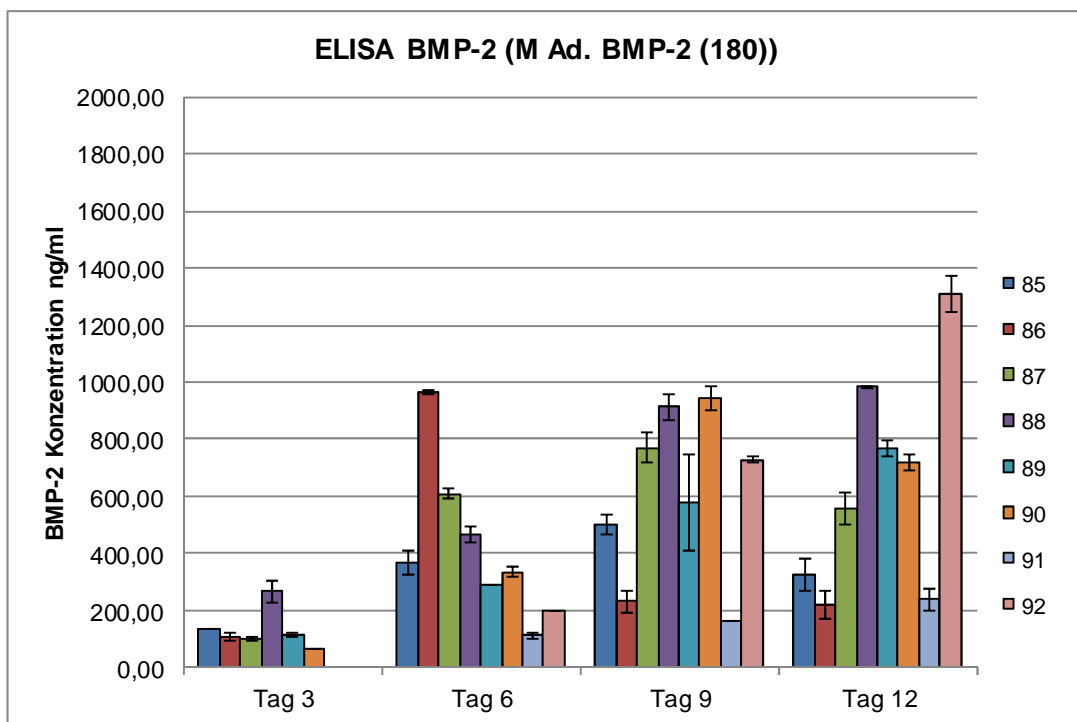


Abbildung 72: Ergebnis des ELISA für die einzelnen Proben der Tiere 85–92. Große Abweichungen ergaben sich ab Tag 9 und Tag 12 zwischen den Proben.

Modifizierter O'Driscoll-Score	L (120)	M (120)	M Ad.BMP-2 (120)	M (180)	M Ad.BMP-2 (180)
I. Vorherrschendes Gewebe	4,38 ± 2,14	3,21 ± 1,94	2,65 ± 1,76	2,98 ± 1,84	3,37 ± 1,62
II. Strukturelle Eigenschaften	2,79 ± 1,63	2,20 ± 1,96	1,75 ± 1,40	1,96 ± 1,55	2,14 ± 1,44
III. Zeichen von Zellveränderungen oder Degeneration	2,38 ± 1,23	2,30 ± 1,14	2,04 ± 0,99	1,59 ± 1,26	2,04 ± 1,04
IV. Degenerationszeichen im angrenzenden Knorpel	2,27 ± 0,77	2,04 ± 0,67	2,14 ± 0,60	1,96 ± 0,79	2,05 ± 0,68
Gesamtpunkte (orig. O'Driscoll-Score)	11,80 ± 4,51	9,74 ± 5,24	8,57 ± 3,62	8,48 ± 3,87	9,60 ± 3,55
V. Anwesenheit von Kollagen I	1,35	0,98	0,88	0,88	1,06
VI. Anwesenheit von Kollagen II	2,13	1,60	1,47	1,70	1,74
Gesamtpunkte (Erweiterungen)	3,48 ± 1,60	2,58 ± 1,39	2,35 ± 1,27	2,58 ± 1,51	2,80 ± 1,62
Gesamtpunktzahl (max. 30)	15,28 ± 5,61	12,33 ± 5,92	10,92 ± 4,57	11,06 ± 4,70	12,40 ± 4,51

Tabelle 14: Erreichte Punktzahlen im erweiterten O'Driscoll-Score (Mittelwerte und Standardabweichungen).

X. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf, Leiter des Instituts für Biotechnologie und Molekulare Tiermedizin der veterinärmedizinischen Fakultät der LMU München, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Ein großer Dank geht an meinen Betreuer, Herrn Dr. hum. biol. Oliver Betz, für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und die sehr gute Zusammenarbeit, besonders während der praktischen Versuchsdurchführung.

Ein großer Dank geht zudem an das gesamte Team im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft. Unserer medizinisch-technischen Assistentin, Frau Bärbel Schmitt MTA, gilt ein ganz besonderer Dank für ihre großartige Unterstützung und Expertise, vor allem bei der histologischen Aufarbeitung der Präparate. Hervorheben möchte ich auch den außerordentlichen Einsatz von Frau Evi Fleischhacker und Herrn Alexander Keller beim Handling der Versuchstiere und Assistenz während der chirurgischen Eingriffe. Ein großes Dankeschön geht auch an Frau Julia Redeker für die Motivation und ihr stets offenes Ohr! Es war eine tolle Zeit mit Euch im Labor, die ich nie missen möchte!

Ich möchte herzlich den Tierpflegern und Tierarzthelfern des Klinikums Rechts der Isar für die Sicherung des reibungslosen Ablaufs von Operationen und für die exzellente Versorgung der Tiere danken.

Ein weiterer großer Dank gilt meinen Kollegen Herrn Dr. med. vet. Korbinian Pieper und Frau Dr. med. vet. Anne von Thaden, die mir die Anästhesie von Schafen mit all ihren Besonderheiten beigebracht haben.

Mein größter Dank aber gilt meiner Familie - meinen lieben Eltern, Franz und Lisbeth Ullmann, meinen Schwestern Kerstin und Katja sowie meinen Schwagern Günter und Thomas. Danke, dass Ihr stets an mich geglaubt habt und immer für mich da seid!

DANKE!